



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/62, A61K 39/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/13155 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. September 1991 (05.09.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00308 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1991 (19.02.91) (30) Prioritätsdaten: P 40 05 874.3 24. Februar 1990 (24.02.90) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : LUBITZ, Werner [AT/DE]; Fürstenstr. 17, D-8000 München 2 (DE). SZOSTAK, Michael, P. [DE/DE]; Karl-Theodor-Str. 31, D-8000 München 40 (DE). (74) Anwälte: FOUQUET, Herbert usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), SU, US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: CARRIER-BOUND RECOMBINANT PROTEIN, PROCESS FOR PRODUCING IT AND ITS USE AS AN IMMUNOGEN AND VACCINE

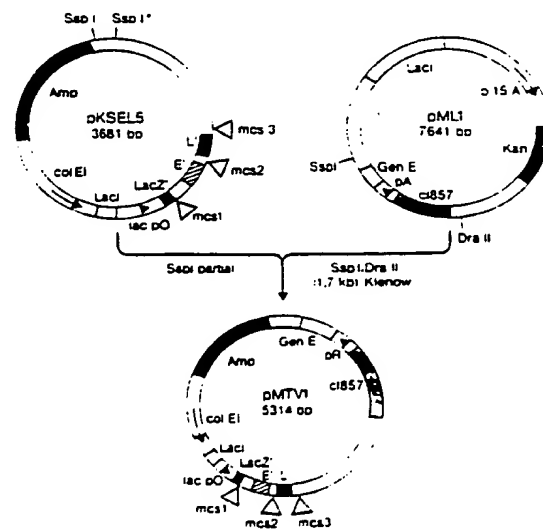
(54) Bezeichnung: TRÄGERGEBUNDENE REKOMBINANTE PROTEINE, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ALS IMMUNOGENE UND VAKZINE

(57) Abstract

A carrier-bound recombinant protein is obtained by expression of a fusion protein gene in Gram negative bacteria that codes for at least a hydrophobic, non-lytic membrane integrating protein domain and for the recombinant protein, and by expressing a gene that codes for a lytic membrane protein from bacteriophages or for a lytic toxin release gene or lytic partial sequence thereof, the carrier-bound recombinant protein being recovered from the culture medium. The recombinant protein is fixedly incorporated in the cell wall complex of Gram negative bacteria by means of a target sequence. Also disclosed are a recombinant DNA used to produce the protein, the process for producing the same and the use of the disclosed carrier-bound recombinant protein for immunisation and as a vaccine.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein trägergebundenes, rekombinantes Protein, erhältlich durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie das rekombinante Protein kodiert und eines Gens das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder für ein lytisch wirkendes Toxinreleasegen oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon kodiert und Gewinnung des trägergebundenen rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe. Das rekombinante Protein wird dabei über eine Targetsequenz fest in den Zellwandkomplex von gramnegativen Bakterien eingebaut. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA zur Herstellung des Proteins, das Herstellungsverfahren sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen rekombinanten Proteine zur Immunisierung und als Vakzine.



Trägergebundene rekombinante Proteine, Verfahren zur
Herstellung und Verwendung als Immunogene und Vakzine

Die Erfindung betrifft trägergebundene rekombinante Proteine, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere als Immunogene und Vakzine.

Die Hauptaufgabe des Immunsystems bei Mensch und Tier besteht in der Abwehr und Vermeidung pathologischer Schäden, die aufgrund von entarteten Zellen infektiösen Viren, Bakterien, Pilzen oder Protozoen entstehen. Das Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, daß eine immer stärker werdende Resistenz nach wiederholten Infekten mit Krankheitserregern auftritt. Ziel der Immunisierung ist es, Abwehrkräfte des Immunsystems gegen bestimmte Krankheitserreger aufzubauen, ohne entsprechende Krankheiten auszulösen.

Antikörper und zelluläre T- und B-Lymphozyten, sorgen für die spezifische Abwehr von Erregern. Dabei ist die Erkennung fremder Strukturen wie z. B. solcher, die auf einer Bakterienzelle vorkommen, eine wesentliche Voraussetzung. Je nach Stimulierung des Immunsystems kann dabei nach Immunisierung eine zeitlich begrenzte oder eine lebenslange Immunität gegen Krankheitserreger aufgebaut werden.

Für die Qualität von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern sowie für die Wirksamkeit von Vakzinen ist es wesentlich, daß die Immunantwort auf das Antigen in ausreichendem Umfang erfolgt. Häufig zeigen jedoch virale Antigene oder rekombinante humane Proteine, wenn sie ohne weitere Modifikation eingesetzt werden, eine schlechte oder gar keine Immunantwort. Aus diesem Grund werden diese Antigene häufig an Träger (vorzugsweise an Proteine) gekoppelt um die Immunantwort zu verstärken. Durch die Bindung der Antigene an den Träger können jedoch die Antigene im oder in der Nähe der antigenen Determinante verändert werden. Dadurch kann die Immunantwort beträchtlich geschwächt werden.

Zur Verbesserung der Immunantwort ist es vorteilhaft, solche Antigene in die äußere Membran von Bakterien einzubauen und diese Komplexe als Immunogene zu verwenden (J. Immunol. 139 (1987) 1658 - 1664, Bacterial Vaccines and Local Immunity - Ann. Sclavor 1986, n.1-2, pp. 19-22, Proceedings of Sclavo International Conference, Siena, Italy, 17-19 November 1986). Auch werden abgeschwächte bzw. abgetötete Erreger (Bakterien oder Viren), aufbereitete Teilkomponenten von Krankheitserregern (Membranproteine von Bakterien, Strukturproteine von Viren) oder rekombinante Lebendvakzine (Viren oder Bakterien) eingesetzt.

Ein Nachteil bei der Verwendung von lebenden Bakterien oder Viren als Immunogene für die Immunisierung liegt darin, daß eine unerwünschte krankheitserregende Ausbreitung der Keime nicht ausgeschlossen werden kann.

Durch Abtötung oder Fragmentierung der Bakterien und Viren vor Verwendung als Immunogen oder Vakzine kann allerdings die antigenen Determinante verändert

werden, wodurch die Immunantwort deutlich geringer sein kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, Immunogene und Vakzine bereitzustellen, die diese Nachteile nicht besitzen.

Diese Aufgabe wird durch ein trägergebundenes, rekombinantes Protein gelöst, welches erhältlich ist durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende, membranintegrierende Proteindomäne sowie für das rekombinante Protein kodiert und eines Gens, das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen, für ein lytisch wirkendes Toxinrelease Gen oder für lytische Teilsequenzen davon (im folgenden als Lyse-Gen bezeichnet) kodiert und Gewinnung des trägergebundenen, rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe.

Vorzugsweise wird die Expression des Fusionsprotein-Gens und des Lyse-Gens von zwei verschiedenen Promotoren (Fig.1) aus gesteuert. Die Expression des Lyse-Gens erfolgt vorzugsweise verzögert gegenüber der Expression des Fusionsproteins.

Durch diese Art der Expression von Fusionsprotein-Gen und Lyse-Gen wird erreicht, daß zunächst eine Vielzahl von Fusionsproteinen in die Membran der als Wirtsorganismus verwendeten gramnegativen Bakterien integriert werden und anschließend eine Lyse dieser Bakterien erfolgt. Der sonst dichte Zellwandkomplex der Bakterien wird dabei so permeabilisiert, daß die cytoplasmatischen Bestandteile der Bakterien freigesetzt werden. (Eur. J. Biochem. 180 (1989), 393 - 398). Die Morphologie der Zellen, beispielsweise die Stäbchenform

von E.coli Zellen, bleibt erhalten. Es bildet sich lediglich in einem abgegrenzten Bereich der Membran eine Tunnelstruktur aus. Die Tunnelbildung wird begleitet durch eine Fusion der inneren und äußeren Membran am Tunnelrand. Die auf diese Weise entstandenen Bakterienhüllen stellen die Träger für das rekombinante Protein dar und werden im weiteren als Bakterienghosts bezeichnet (Fig. 2).

Die Bakterienghosts bestehen aus cytoplasmatischer (innerer) Membran, periplasmatischem Raum und äußerer Membran, wobei die Integrität des Zellwandkomplexes weitgehend erhalten bleibt. Für Bakterienstämme, die zusätzlich eine S-Layer-Schicht (parakristalline Proteinschicht außerhalb der äußeren Membran) aufweisen, ist diese Proteinschicht ebenfalls Bestandteil der Bakterienghosts (Ann. Rev. Microbiol. 37 (1983), 311-339). Die Bakterienghosts sind somit Träger der rekombinanten Proteine (Immunogene) und stellen gleichzeitig aufgrund ihres Aufbaus (Peptidoglykan, Lipopolysaccharid) das Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort dar.

Als Wirtsorganismen sind alle gramnegativen Bakterien, vorzugsweise gramnegative Krankheitserreger wie z.B. *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* geeignet (Schaechter, M, H. Medoff, D. Schlesinger, Mechanisms of Microbial Disease. Williams and Wilkins, Baltimore (1989)).

Die erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine eignen sich überraschend gut als Immunogene,

wobei es zu ausgeprägten Immunantworten und sehr hohen Antikörper-Titern kommt.

Ein besonderer Vorteil ergibt sich dadurch, daß das rekombinante Protein direkt nach der Expression in die Membran der Bakterien integriert und so die Trägerbindung hergestellt wird. Damit erübrigt sich die Isolierung des rekombinanten Proteins als solches vor Herstellung des Immunogens. Da es zudem für die Herstellung von immunogenhaltigen Bakterienghosts ausreichend ist, wenn einige hundert bis zur maximal möglichen Anzahl (ca. 50000) rekombinante Antigene in die Membran der Bakterienghosts integriert sind, erübrigt sich eine Überexpression des rekombinanten Proteins.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß sehr viele antigene Epitope im Zellwandkomplex der Bakterienghosts präsentiert werden. Es hat sich gezeigt, daß die Targetsequenzen für die rekombinanten Proteine bestimmte Bereiche innerhalb des Bakterienzellwandkomplexes zur Integration bevorzugen. Diese Bereiche stellen hauptsächlich Adhäsionsstellen der inneren und äußeren Membran dar und stehen mit der Zellteilung der Bakterien in Verbindung. Dadurch kommt es zu keiner uniformen Verteilung des rekombinanten Proteins sondern zu inselartigen Anreicherungen innerhalb des Zellwandkomplexes (vgl. Fig. 2d). Die gehäufte Anordnung der rekombinanten Proteine innerhalb eines relativ kleinen Bereichs (cluster) hat den Vorteil, daß Immunglobulin-tragende B-Zellen zur Proliferation angeregt werden. Zum anderen wirkt das in den Bakterienhüllen vorhandene Lipopolysaccharid als Mitogen und löst ebenfalls ein Signal zur Zellteilung aus. Damit erhält man eine effektive Stimulation der B-Zell-spezifischen Produktion von Immunglobulinen.

Weiter hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine in ihren natürlichen Proteinstrukturen und damit in aktiver Form in die Bakterienmembran integriert sind.

Dies ist besonders überraschend, da üblicherweise rekombinante Proteine nach Expression in Prokaryonten als inclusion bodies (vgl. EP-A 0219 874, WO 89/03711) in inaktiver Form erhalten werden und erst anschließend durch Denaturierung und Renaturierung in die aktive Form übergeführt werden können.

Als rekombinante Proteine geeignet sind alle dem Fachmann geläufigen Proteine. Besonders bevorzugt werden Humanproteine und Antigene, insbesondere virale Antigene verwendet. Ihre Größe ist nicht begrenzt. Vorzugsweise beträgt das Molekulargewicht der Antigene aber 2000 bis 200000 Dalton.

Besonders bevorzugt weist das rekombinante Antigen antigene Strukturen von humanen Viren und Retroviren wie z.B. von HIV, HBV und EBV auf.

Die hydrophoben, nicht lytisch wirkenden und membranintegrierenden Proteindomänen werden im weiteren als Targetsequenzen bezeichnet. Bevorzugt sind als Targetsequenzen komplette Sequenzen oder Teilsequenzen von Membranproteinen, die jedoch auch durch Aminosäureaustausche modifiziert sein können. Ein solcher Austausch darf jedoch die Struktur des entsprechenden Proteins nicht verändern.

Vorzugsweise werden solche Targetsequenzen verwendet, die - im Unterschied zu Signalsequenzen von anderen Membranproteinen- durch in der Membran vorkommende Proteasen (z. B. Signalpeptidase und Proteasen des periplasmatischen Raums) nicht gespalten werden. Targetsequenzen können beispielsweise durch Proteinengineering aus natürlich vorkommenden Sequenzen des Lysisgens der PhiX174 Phagengruppe (für N-terminales Targeting) sowie aus den natürlich vorkommenden Sequenzen des Lysisgens der MS2 Phagengruppe (für C-terminales Targeting) abgeleitet werden.

Als Targetsequenz eignet sich vorzugsweise eine hydrophobe alpha-helicale Proteindomäne aus 14 bis 20 Aminosäuren, die N- und C- terminal von jeweils 2 bis 30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein kann. Vorzugsweise kann an diese Proteindomäne mindestens eine weitere Proteindomäne gebunden sein. Die Bindung erfolgt vorzugsweise über flexible Linkersequenzen. Unter flexiblen Linkersequenzen sind hydrophile Aminosäuresequenzen mit 2 bis 100 Aminosäuren, vorzugsweise mit 2 bis 30 Aminosäuren, und mit ungeordneter Sekundärstruktur zu verstehen (Turn- und Random Coil-Sequenzen).

Die weiteren Proteindomänen, die an die erste Proteindomäne gekoppelt sind, können analog wie die erste Proteindomäne aufgebaut sein. Es ist jedoch bevorzugt, daß mindestens eine der weiteren Domänen eine β -Faltblattstruktur besitzt und aus 10 bis 16 Aminosäuren, vorzugsweise 11 bis 13 Aminosäuren, aufgebaut ist. Solche β -Faltblattstrukturen gleichen vorzugsweise in ihrem Aufbau und ihrer Sekundärstruktur amphipathischen Proteinsequenzen, die in Porinen der

äußeren Membranen vorkommen. Für ein N-terminales Targeting ist es bevorzugt, solche Targetsequenzen zu verwenden, welche die Aminosäuren 1 bis 54 von Protein E aus dem Phagen PhiX174 enthalten (im weiteren als E'-Sequenz bezeichnet) und nicht lytisch wirken. Für ein C-terminales Targeting ist es bevorzugt, Targetsequenzen zu verwenden, welche die Aminosäuren 21 bis 75 von Protein L aus dem Phagen MS2 enthalten (im weiteren als L'-Sequenz bezeichnet) und nicht lytisch wirken. (Sequenzen vergleiche EP-A 0 291 021). Ebenso geeignet sind Sequenzen, die sich aus den genannten Sequenzen der E- und L-Targetsequenzen durch einen homologen Aminosäureaustausch, der keine Veränderung der Proteinsekundärstruktur verursacht, ableiten.

Unter Membranproteinen von Bacteriophagen sind vorzugsweise Membranproteine von Bacteriophagen der Klasse Mikroviridae, vorzugsweise von icosahedralen, lytischen und ssDNA enthaltenden Phagen, die Enterobacteriaceae infizieren können, zu verstehen. Beispiele hierfür sind die Phagen PhiX174, S13, G4, G6, G14, PhiA, PhiB, PhiC, PhiR, welche E. coli C Stämme infizieren können. Ebenso geeignet ist alpha3, welcher E. coli C und E. coli B Stämme infizieren kann. Ebenso geeignet sind die Phagen K9, St-1, PhiK, PhiXtB und U3, welche E. coli K12 Stämme infizieren können (Sinsheimer R.L. (1968) in: Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol (Davidson J.N. & Cohn W.W., eds) Vol.8, Academic Press, New York & London, pp. 115-169; Tessman E.S. & Tessmann I. (1978) in: The single-stranded DNA Phages (Denhardt D.T., Dressler D. & Ray D.S., eds.) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 9-29; Hayashi M., Aoyama A., Richardson D.L. & Hayashi M.N. (1987) in: The Bacteriophages, pp. 1-71).

Als lytisch wirksame Membranproteine sind vorzugsweise Lyseproteine aus den genannten Bakteriophagen sowie andere Toxin-release Gene wie Colicin Lysegen (Microbiol. Sciences 1 (1984) 168-175 und 203 -205) geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist an das rekombinante Protein ein nicht kovalent bindender Bindungspartner für dieses Protein, an den gegebenenfalls noch weitere Substanzen kovalent oder nicht kovalent gebunden sind, gebunden. Beispiele für Bindungspaare, deren Partner als Bindungspartner geeignet sind, sind beispielsweise Biotin - Streptavidin bzw. Avidin, Hapten - Antikörper, Antigen - Antikörper, Konkavalin - Antikörper, Zucker - Lectin, Hapten - Bindeprotein (z.B. Thyroxin bindendes Globulin und Thyroxin) oder Oligopeptid-Antikörper.

Bevorzugt wird als bindendes Paar Streptavidin bzw. Avidin und Biotin eingesetzt. Besonders bevorzugt wird als immobilisiertes, rekombinantes Protein Streptavidin bzw. Avidin verwendet und daran biotinyliertes Antigen gebunden.

Weiter ist es bevorzugt als rekombinantes Protein ein Protein zu verwenden, das einen chemischen Liganden erkennt. Beispiele hierfür sind β -Galactosidase/p-Aminophenyl- β -D-thiogalactosid (ein Strukturanalages der Lactose), Gene 29 (1984) 27-31. Durch die Erkennung des aktiven Zentrums der β -Galactosidase ohne eine Spaltung des Substrats, werden derartig substituierte Produkte an die Bakterienghost gebunden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA, die eine erste DNA-Sequenz (DNA-Targetsequenz), welche für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne codiert, eine zweite DNA-Sequenz (DNA-Proteinsequenz), die für ein rekombinantes Protein kodiert, sowie eine unter davon getrennter Kontrolle stehenden DNA-Sequenz (DNA-Lysegene), die für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-release-Gen oder für deren lytisch wirkenden Teile kodiert, enthält.

Als DNA-Targetsequenzen werden DNA-Sequenzen bevorzugt, welche für das L'- Protein oder E'- Protein kodieren. Ebenso geeignet sind DNA-Sequenzen, die für von diesen Proteinen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit gleicher Sekundärstruktur kodieren. Diese Sequenzen sind vorzugsweise durch DNA-Sequenzen verbunden, die für hydrophile Proteindomänen mit 2 bis 30 Aminosäuren und ungeordneter Sekundärstruktur codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die DNA-Lysegene die DNA-Sequenz des E-Proteins, die DNA-Sequenz des L-Proteins oder die DNA-Sequenz des EL-Hybridproteins (Sequenzen vgl. EP-A 0 291 021). Ebenso geeignet sind Teilsequenzen davon, die lytisch wirken.

Die DNA-Proteinsequenz ist vorzugsweise die DNA-Sequenz eines viralen Antigens (z. B. HIV, HBV, EBV) oder eines rekombinanten Humanproteins.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines trägergebundenen, rekombinanten Proteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß in gramnegativen Bakterien ein Fusionsprotein, welches mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende, membranintegrierende Proteindomäne sowie ein rekombinantes Protein enthält und ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxinrelease Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon exprimiert werden und das trägergebundene, rekombinante Protein aus der Kulturbrühe gewonnen wird. Die Transformation und Expression kann nach den dem Fachmann geläufigen Verfahren erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Transformation durch Elektroporation oder Konjugation.

Vorzugsweise wird während der Fermentation zunächst die Aktivität des lytischen Proteins inhibiert oder die Expression des Lysegens reprimiert und erst zu einem gewünschten Zeitpunkt, vorzugsweise in der späten logarithmischen Phase, die Inhibierung oder Repression aufgehoben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das so gewonnene trägergebundene, rekombinante Protein mit einem gegebenenfalls derivatisierten Bindungspartner für das Protein inkubiert und das entstandene Konjugat isoliert. Als Bindungspartner sind die oben genannten Partner der Bindungspaare geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Gene von mindestens zwei verschiedenen rekombinanten Proteinen erfindungsgemäß exprimiert. Dadurch können Immunogene oder Vakzine erhalten werden, die mehrere antigene Strukturen aufweisen. Besonders bevorzugt ist es hierbei, als rekombinante Proteine die antigenen

Determinanten von verschiedenen Viren oder Retroviren (z.B. HIV1, HIV2, HBV und EBV) zu verwenden. Zur Expression können diese Gene in einem Expressionsvektor entweder als offener Leserahmen in 3'-Richtung nach dem Gen der Targetsequenz angeordnet sein oder es kann für jedes zu exprimierende rekombinante Protein ein eigener Vektor verwendet werden. In diesem Fall ist es jedoch erforderlich, daß die Vektoren mit jeweils anderen origins of replication und anderen Resistenzgenen versehen sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Säugetier mit einem trägergebundenen, rekombinanten Protein, welches erhältlich ist durch Expression eines Fusionsprotein in gramnegativen Bakterien und welches mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membran-integrierende Proteindomäne sowie das rekombinante Protein enthält, gegebenenfalls dazu verzögerter Expression eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bacteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxin-release Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon immunisiert wird und die Antikörper aus dem Serum oder der Milz nach bekannten Verfahren gewonnen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agenzien mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert, die Zelllinie, welche die gewünschten Antikörper produziert, kloniert und kultiviert und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die monoklonalen Antikörper gewonnen.

Es hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren besonders zur Herstellung von viralen Immunogenen, wie z.B. HIV-Immunogenen, HBV-Immunogenen, geeignet ist.

Ebenso hat sich überraschenderweise gezeigt, daß rekombinante Antigene, die bei der Expression in Prokaryonten üblicherweise in inaktiver Form als refractile bodies anfallen (z.B. Humanproteine wie tPA oder G-CSF) bei der Expression nach dem erfindungsgemäßen Verfahren in ihrer Aktivität und damit in ihren antigenen Strukturen erhalten bleiben. Damit erweist sich das erfindungsgemäße Verfahren als besonders vorteilhaft bei der Herstellung immunogener rekombinanter Humanproteine.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen rekombinanten Proteine als Impfstoffe (Vakzine) und zur Stimulierung von T-Lymphozyten.

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können in üblicher Weise hergestellt und verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine. Die Herstellung dieser Impfstoffe kann nach den bekannten Methoden durchgeführt werden. Bevorzugt wird jedoch das trägergebundene, rekombinante Protein zunächst lyophilisiert und anschließend, ggf. unter Zusatz von Hilfsstoffen, suspendiert.

Es ist weiter bevorzugt, das Vakzin als multivalentes Vakzin zu formulieren. Hierzu kann das erfindungsgemäße trägergebundene rekombinante Protein mehrere an der

Membran des Bakterienghosts immobilisierte rekombinante Antigene enthalten.

Die Impfung mit dem erfindungsgemäßen Vakzin kann auf die jedem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intradermal, intramuskular, intraperitoneal, intravenös, subkutan, oral und intranasal.

Zur intramuskulären oder subkutanen Gabe kann das Vakzin beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sein. Zur intranasalen oder intraoccularen Applikation kann das Vakzin, beispielsweise in Form eines Sprays oder einer wäßrigen Lösung angewendet werden. Für lokale, beispielsweise orale Gabe ist es häufig erforderlich, die Immunogene zeitweise gegen Inaktivierung zu schützen, beispielsweise gegen saccharolytische Enzyme in der Mundhöhle oder gegen proteolytische Enzyme im Magen. Ein derartiger vorübergehender Schutz kann beispielsweise durch Verkapselung der Immunogene erfolgen. Diese Verkapselung kann beispielsweise durch Überziehen mit einem Schutzmittel (Mikroverkapselung) oder bei Einbettung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Immunogenen in einen schützenden Träger (Makroverkapselung) erfolgen.

Das Verkapselungsmaterial kann semipermeabel sein oder beim Einbringen in den menschlichen oder tierischen Körper semipermeabel werden. Üblicherweise wird für die Verkapselung eine biologisch abbaubare Substanz als Träger verwendet.

Die nachfolgenden Beispiele, Abbildungen und Sequenzprotokolle erläutern die Erfindung weiter.

Fig.1 zeigt schematische Darstellungen der Plasmide pkSELS, pML1 und pMTV1

Fig.2 Schematische Darstellung eines Bakterienghosts, als Träger rekombinanter Proteine

- a) Längsschnitt durch ein gramnegatives Bakterium (om: äußere Membran; pp: periplasmatischer Raum, im: innere (cytoplasmatische) Membran, cp: Cytoplasma).
- b) Ausbildung eines transmembranen Lysetunnels.
- c) Durch den Lysetunnel ausströmendes Cytoplasma.
- d) Bakterienghost mit Fusionsproteinen, die im Zellwandkomplex über Targetsequenzen verankert sind.

Beispiel 1

N-terminales Membrantargeting für HIV 1 gp41.

Aus dem Plasmid pHF14 wird ein HIV 1 spezifisches DNA-Fragment durch einen partiellen HincII/PvuII Verdau als ein 1445bp DNA-Fragment isoliert. Das Fragment enthält die gesamte Sequenz von gp41, (345 Codons von gp41) Linker Sequenzen, die letzten 45 Codons von gp120. Es entspricht den Nucleotiden 4 bis 1448 aus SEQ ID NO: 1.

Nach Linearisieren von Plasmid pKSEL5 (SEQ ID NO:6) mit AccI und Auffüllen der überhängenden DNA-Enden mit Klenow Polymerase wird das HIV1 spezifische DNA-Fragment mit diesem linearisierten Plasmid ligiert. Das entstandene Plasmid wird mit pHIE1 bezeichnet und enthält in frame eine Fusion einer Teilsequenz des E-Gens (E'-Targetsequenz) von PhiX174 mit dem oben genannten HIV1-Fragment, wobei das natürliche Stoppcodon des HIV1 env-Gens erhalten bleibt.

Beispiel 2

N- sowie C- terminales Membrantargeting von HIV1 gp41.

Aus Plasmid pHF14 wird durch HincII-Verdau ein 1059 bp HIV1 spezifisches DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält 5'-seitig Linker Sequenzen gefolgt von 45 Codons aus gp120 sowie 301 Codons von gp41. Es entspricht den Nucleotiden 4 bis 1062 aus SEQ ID NO:1. Nach Linearisieren von Plasmid pKSEL5 mit AccI und nach Auffüllen der überstehenden DNA-Enden mit Klenow Polymerase wurde das HIV1 spezifische DNA-Fragment mit diesem Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid pHIE3

- 17 -

enthält eine in frame Fusion einer Teilsequenz des E-Gens (E'-Targetsequenz) mit einer HIV Teilsequenz und einer Teilsequenz des L-Gens (L'-Targetsequenz).

Beispiel 3

C-terminales Membrantargeting von HIV1 gp41.

Aus Plasmid pHF14 wird mit SalI und HincII ein 1061 bp DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält 5'-seitig Linker Sequenzen gefolgt von 45 Codons gp120 sowie 301 Codons gp41. Es entspricht den Nucleotiden 2 bis 1062 aus SEQ ID NO: 1. Nach Entfernen der E'-Sequenz aus dem Plasmid pKSEL5 durch XhoI/AccI-Verdau werden mit Hilfe von Klenow Polymerase die überstehenden DNA-Enden des Vektors und des isolierten HIV1 Fragment aufgefüllt und ligiert. Das entstandene Plasmid pHIE5 enthält eine in frame Fusion der ersten 5 Codons des lacZ-Gens, Polylinker Codons, gp120/gp41 Codons und Polylinker Codons gefolgt von der L'-Targetsequenz.

Beispiel 4

C-terminales Membrantargeting von Streptavidin.

Das 498 bp mit Klenow Polymerase aufgefüllte XbaI-Fragment (FXaStrpA, Nucleotid 2 bis 499 von SEQ ID NO:2) aus pFN6 wird in das Plasmid pKSEL5, aus welchem das E'-Gen-Fragment durch Schnitt mit HincII/XhoI deletiert wurde, in die aufgefüllten Schnittstellen ligiert. Das erhaltene Plasmid wird mit pAV5 bezeichnet. Damit ergibt sich im Plasmid pAV5 eine in frame Fusion der ersten 5 Codons des LacZ-Gens, 26 Aminosäurecodons aus der verbleibenden Polylinker Sequenz sowie der Aminosäuresequenzen des FXaStrpA-Anteils gefolgt von der L'Targetsequenz.

Beispiel 5

N-terminales Membrantargeting von Streptavidin.

Aus Plasmid pFN6 wird nach BamHI-Verdau das 5'-seitig um eine Faktor Xa-Proteasen-Schnittstelle erweitertes Streptavidin-Gen als 511 bp Fragment isoliert. Es enthält Nucleotid 14 bis 524 aus SEQ ID NO:2. Dieses DNA-Fragment wird nach Auffüllen der Enden mit Klenow Polymerase in die aufgefüllte XbaI Schnittstelle des Vektors pKSEL5 zwischen die E' und L' Targetsequenzen integriert. In Plasmid pAV1 ist damit in frame eine Gen-Fusion aus der E'-Targetsequenz und der FXaStrpA-Sequenz erfolgt. Die 3'-seitig des Streptavidins vorkommenden Stoppcodons bleiben durch die vorgenommene Klonierung erhalten.

Beispiel 6

N- und C- terminales Membrantargeting von Streptavidin.

Die in Plasmid pAV1 hinter dem Streptavidin-Gen vorkommenden Stoppcodons 5'-TAATAA-3' werden durch die Deletion eines 33bp großen DNA-Fragments, das durch partiellen HincII und nachfolgenden XbaI Verdau erzeugt wird, entfernt. Die Streptavidinspezifische DNA-Sequenz enthält Nucleotid 14 bis 499 aus SEQ ID NO:2. Nach Auffüllen der Plasmid-Enden mit Klenow Polymerase und Religation, fusioniert die auf dem Vektor enthaltene L'-Targetsequenz in frame an die E'-Targetsequenz und die FXaStrpA-Sequenz (Plasmid pAV3). Das entsprechende Genprodukt verfügt damit über eine N- sowie C-terminale Targetsequenz.

Beispiel 7

N-terminales Membrantargeting von β -Galactosidase.

Aus dem Plasmid pMC1403 (J. Bacteriol. 143 (1980) 971 - 980) wird mit Hilfe von PstI und DraI ein 3124 bp DNA-Fragment (SEQ ID NO:3) isoliert und gerichtet in die PstI und NruI Restriktionsstellen des Plasmids pKSEL5 ligiert. Das entstandene Plasmid pLZ1 enthält die ersten 54 Codons der E'-Targetsequenz, 13 Linker-Codons und 1015 Codons des LacZ Gens. Das für Plasmid pLZ1 verwendete PstI/DraI-Fragment erstreckt sich im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 3 von Nucleotid 26 bis einschließlich 3149 und umfaßt 3124bp.

Beispiel 8

N- und C- terminales Membrantargeting von β -Galactosidase.

Aus Plasmid pMC1403 wird das 3010 bp LacZ DNA-Fragment (PstI - EcoRI, Nucleotide 26 bis 3035 aus SEQ ID NO: 3) isoliert und in die PstI/HindIII Restriktionsstelle von pKSEL5 nach Auffüllen der EcoRI bzw. HindIII Enden gerichtet integriert. Damit ergibt, sich in dem so erhaltenen Plasmid pLZ3 eine Fusion in frame der E'-Targetsequenz mit dem LacZ-Gen und der L'-Targetsequenz.

Beispiel 9

C-terminales Membrantargeting von β -Galactosidase.

Plasmid pLZ3 wird mit EcoRI und partiell mit AccI verdaut. Dadurch wird die E'-Targetsequenz entfernt. Das Fragment enthält die Nucleotide 29 - 3035 aus SEQ ID NO:3 und ist 3007 bp lang (nach Auffüllen der EcoRI-Schnittstelle). Nach Auffüllen der überstehenden DNA-Enden des Vektors und Religation ergibt sich der Vektor pLZ5 in welchem ein lacZ-L'-Fusionsgen vorliegt und dessen Genprodukt über C-terminale Membrantargetsequenz verfügt.

Beispiel 10

Herstellung der trägergebundenen rekombinanten Proteine über die Plasmide pMTV1 (SEQ ID NO:4), pkSEL und pML1 (SEQ ID NO:5).

Auf den Plasmiden pMTV1 und pML1 befindet sich eine Lysekassette, bestehend aus dem Lambda cI857 Repressor-Gen, dem rechtsseitigen Lambdapromotor/Operator System pR sowie dem PhiX174 Lysegen E.

Die Integration des Fremdgens kann in der multiple cloning site mcs 2 für pMTV1 oder pkSEL5 (Fig.1) erfolgen. Dabei wird in analoger Weise wie in den Beispielen 1 - 9 beschrieben vorgegangen.

Beispiel 11

Fermentation und Lyse

Das Plasmid wird in E. coli K12 (DSM 2093) integriert und die Kultur im Schüttelkolben bis zu OD 0,8 - 1,2 bei 600 nm angezogen, wobei die Expression des Lysegens E durch cI857 Repressormoleküle reprimiert ist (Eur. J. Biochem. 180 (1989) 393 bis 398). Durch Temperaturerhöhung auf 42°C während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien erfolgt die Expression von Gen-E durch thermische Inaktivierung der cI857 Repressormoleküle. Die durch Protein E verursachte Lyse von E. coli setzt je nach Kulturmedium (Voll- oder Minimalmedium, unter Belüftung im Schüttelwasserbad) der Bakterien zwischen 10 bis 30 min nach Temperaturerhöhung ein. Nach weiteren 10 bis 30 min ist die Lyse vollständig.

Beispiel 12**Modifizierte Protein E-Lyse.**

Es wird wie in Beispiel 11 kultiviert, wobei jedoch 30 min. vor Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C das Kulturmedium durch Zugabe von Magnesiumsulfatlösung auf 0,2 mol/l Magnesiumsulfat gebracht wird. Dies verhindert trotz Expression von Gen E die Lyse der Bakterien.

30 min. nach Temperaturerhöhung werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspension des Zellpellets in niedermolarem Puffer (PBS, 1 mmol/l Phosphatpuffer, 1 bis 10 mmol/l Tris - HCl pH 6 - 8) oder Wasser erfolgt eine sofortige Lyse der Zellen. Die dabei anfallenden Zellhüllen werden als Bakterienghosts bezeichnet. Bei diesen Bedingungen, die einer Kombination von Protein E-Lyse und osmotischem Schock entsprechen, wird eine größere Lysestruktur in den Bakterien erreicht. Die Morphologie der Bakterienghosts bleibt auch unter diesen Bedingungen weitgehend erhalten.

Zur Reinigung werden die Bakterienghost 2 x mit PBS oder 0,9 % NaCl gewaschen (resuspendieren und zentrifugieren) und gefriergetrocknet.

Beispiel 13

Immunisierung

10^9 Keime (entsprechend 1 mg Bakterienghosts Trockengewicht) pro Maus werden in 0,9 % NaCl intraperitoneal 4 x in monatlichen Abständen zur Immunisierung gegeben. 8 Tage nach der letzten Immunisierung wird Serum gewonnen und die Antikörper werden isoliert.

Beispiel 14

Bindung von biotinyliertem HBc-Antigen

Nach Beispiel 4 hergestellte Bakterienghosts, in die Streptavidin über Targetsequenzen integriert ist, werden lyophilisiert. 1 mg dieses Lyophilisats wird 10 ml einer Lösung von 20 μ g/ml eines Konjugats aus Hepatitis B core-Antigen und Biotin (hergestellt durch Reaktion von HBcAg mit N-Hydroxysuccinimid-aktiviertem Biotin) in 40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, 30 min inkubiert und anschließend mehrfach mit 40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Auf diese Weise wird ein trägergebundenes HBcAg-Immunogen erhalten, das zur Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern verwendet werden kann.

Sequenzprotokolle

SEQ ID NO:1

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz

HIV1 (gp120/gp41)

SEQUENZLÄNGE:1451 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

gtogacctgc	aggcatgcaa	gctGATCTTC	AGACCTGGAG	GAGGAGATAT	GAGGGACAAT	60
TGGAGAAGTG	AATTATATAA	ATATAAAGTA	GTAAAAATTG	AAACATTAGG	AGTAGCACCC	120
ACCAAGGCAA	AGAGAAGAGT	GGTGCAGAGA	GAAAAAAGAG	CAGTGGGAAT	AGGAGCTTTG	180
TTCTTGGGT	TCTTGGGAGC	AGCAGGAAGC	ACTATGGGOG	CAGCGTCAAT	GAOGCTGAOG	240
GTACAGGCCA	GACAATTATT	GTCIGGTATA	GTGCAGCAGC	AGAACAATTT	GCTGAGGGCT	300
ATTGAGGGCC	AACAGCATCT	GTTCGCACTC	ACAGTCTGGG	GCATCAAGCA	GCTCCAGGCA	360
AGAATCCTGG	CTGTGGAAAG	ATACCTAAAG	GATCAACAGC	TCCTGGGGAT	TTGGGGTTGC	420
TCGTGAAAAC	TCATTTGCAC	CACCTGCTGTG	CCTTGGGAATG	CTAGTTGGAG	TAATAAATCT	480
CTGGAACAGA	TTTGGGAATAA	CATGACCTGG	ATGGAGTGGG	ACAGAGAAAT	TAACAATTAC	540
ACAAGCTTAA	TACACTCCTT	AATTGAAGAA	TOGCAAAACC	AGCAAGAAAA	GAATGAACAA	600
GAATTATTGG	AATTAGATAA	ATGGGCAAGT	TTGTGGAATT	GGTTTAACAT	AACAAATTGG	660
CTGTGGTATA	TAAAATTATT	CATAATGATA	GTAGGAGGCT	TGGTAGGTTT	AAGAATAGTT	720
TTTGCTGTAC	TTTCTATAGT	GAATAGAGTT	AGGCAGGGAT	ATTACACCATT	ATOGTTTCAG	780
ACCCACCTCC	CAAACCOGAG	GGGACCOGAC	AGGCCCGAAG	GAATAGAAGA	AGAAGGTGGA	840
GAGAGAGACA	GAGACAGATC	CATTGATTGA	GTGAACGGAT	CCTTAGCACT	TATCTGGGAC	900
GATCTGOGGA	GCCTGTGCCT	CTTCAGCTAC	CACCGCTTGA	GAGACTTACT	CTTGATTGTA	960
ACGAGGATTG	TGGAACCTCT	GGGAOCGAGG	GGGTGGGAAG	CCCTCAAATA	TTGGTGGGAAT	1020
CTCCTACAGT	ATTGGAGTCA	GGAACATAAG	AATAGTGCCT	TFAACTTGCT	CAATGCCACA	1080
GCTATAGCAG	TAGCTGAGGG	GACAGATAGG	GTTATAGAAT	TAGTACAAGC	AGCTTATAGA	1140
GCCATTGGCC	ACATACCTAG	AAGAATAAGA	CAGGGCTTGG	AAAGGATTTT	GCTATAAgat	1200
gggtggcaag	tggtcaaaaa	gtagtgtggt	tggtatggct	gctgtaaggg	aaagaatgag	1260
acgagctgag	ccagcagcag	atgggtgagg	agcagtatct	cgagacctag	aaaaacatgg	1320
agcaatcaca	agtagcaata	cagcagctac	caatgcogat	tgtgcttggc	tagaagcaca	1380
agaggaggag	gaggtgggtt	ttccagtcac	acctcaggta	cctttaagac	caatgactta	1440
caaggcagct	g					1451

In Großbuchstaben dargestellt ist der C-Terminus von gp160 von HIV1 (Originalkoordinaten des BH8-Klons: 7199 bis 8372 (nach Ratner et al. 1985)). Nach den 45 letzten Codons des C-Terminus von gp120 (5'-ATCTTCAGAGAAAAAAGA-3') folgen die 345 Codons des gp41 (5'-GCAGTGGGAATTTGTCTATAA-3'). 5'-seitig der HIV1-Sequenz erstreckt sich der für die folgenden Klonierungen verwendete Polylinker.

Referenz: Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, Jr. S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghrayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., Wong-Staal, F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature 313: 277 - 284.

SEQ ID NO:2

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (FXa-Strpa)

SEQUENZLÄNGE:525 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

DNA sequence FXa-StrpA 525 b.p. complete sequence ;

```
tctagaacta gtggatccat ogagggtagg tctATGGACC OGTCGAAGGA CTCCAAAGCT 60
CAGGTTTCTG CAGCOGAAGC TGGPATCACT GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTGACT 120
TTCATTGTGA COGCTGGTGC GGAOGGAGCT CTGACTGGCA CCTAOGAATC TGCGGTTGGT 180
AAGCAGAAT CCOGCTACGT ACTGACTGGC OGTTATGACT CTGCACCTGC CACOGATGGC 240
TCTGGTACOG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGOGCACAGC 300
GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATAOGTGGC GGTGCTGAGG CTGTATCAA CACTCAGTGG 360
CTGTTAACAT COGGCACTAC OGAAGOGAAT GCATGGAAAT OGACACTAGT AGGTCATGAC 420
ACCTTTACCA AAGTTAAGCC TTCCTGCTGCT AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA 480
AACAAOGGTA ACCCTCTAGA OGCTGTTCAG CAATAAataag gatcc 525
```

In Großbuchstaben dargestellt ist die Streptavidinsequenz (Argarana et al. 1986). Die für die Faktor Xa-Spaltstelle Ile-Glu-Gly-Arg kodierende DNA-Sequenz 5'-atogagggtagg-3' reicht in der hier aufgeführten Sequenz von Nukleotid 19 bis 30.

Referenz :

Argarana, C.E., Kuntz, I.D., Birken, S., Axel, R., Cantor, Ch.R. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. Nucl. Acids Res. 14 (4): 1871 - 1882.

SEQ ID NO:3

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (LacZ)

SEQUENZLÄNGE:3152 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

ATGACCATGA	TTACGAATTG	CTGCAGGTGG	AOGGATCCCG	TGGTTTTACA	AOGTGTGAC	60
TGGGAAAACC	CTGGGGTTAC	CCAACCTAAT	OGCCTTGCG	CACATCCCC	TTTGGCCAGC	120
TGGGGTAATA	GOGAAGAGGC	COGCACOGAT	OGCCCTTCCC	AACAGTTGCG	CAGCCTGAAT	180
GGOGAATGGC	GCTTTGCCTG	GTTTCOGGCA	CCAGAAGOGG	TGCOGGAAAG	CTGGCTGGAG	240
TGOGATCTTC	CTGAGGCOGA	TACTGTGCTC	GTCCTCTCAA	ACTGGCAGAT	GCAOGGTTAC	300
GATGOGCCCA	TCTACACCAA	CGTAACCTAT	CCCATTAOGG	TCAATCOGCC	GTTTGTTCCT	360
AOGGAGAATC	OGAOGGGTGG	TTACTOGCTC	ACATTTAATG	TTGATGAAAG	CTGGCTACAG	420
GAAGGOCAGA	OGOGAATTAT	TTTTTGATGGC	GTTAACTCGG	CGTTTCATCT	GTCGGTCAAC	480
GGGCGCTGGG	TOGGTTACGG	CCAGGACAGT	CGTTTGCGGT	CTGAATTTGA	CCTGAGOGCA	540
TTTTTAAOGG	COGGAGAAAA	COGCTOGCG	GTCATGGTGC	TGOGTTGGAG	TGAOGGCGAT	600
TATCTGGAAG	ATCAGGATAT	GTGGOGGATG	AGOGGCAATT	TCOGTGAOGT	CTOGTTGCTG	660
CATAAACOGA	CTACACAAAT	CAGOGATTTT	CATGTTGCCA	CTOGCTTTAA	TGATGATTTT	720
AGCOGOGCTG	TACTGGAGGC	TGAAGTTCAG	ATGTGOGGOG	AGTTGOGTGA	CTACCTAOGG	780
GTAACAGTTT	CTTTATGGCA	GGGTGAAAG	CAGGTGOGCA	GOGGCAOGC	GCTTTTGGGC	840
GGTGAATTA	TOGATGAGCG	TGGTGGTTAT	GCOGATOGCG	TCACACTAOG	TCGTAAOGTC	900
GAAAACCOGA	AACTGTGGAG	OGCOGAAATC	CGAATCTCT	ATOGTGOGGT	GGTTGAAGTG	960
CACACOGCOG	ACGGCAOGCT	GATTGAAGCA	GAAGCCGCG	ATGTGGGTTT	COGOGAGGTG	1020
CGGATTGAAA	ATGGTCTGCT	GCTGCTGAAC	GGCAAGCGGT	TGCTGATTOG	AGGOGTTAAC	1080
OGTCAOGAGC	ATCATCCTCT	GCTGGTTCAG	GTCATGGATG	AGCAGACGAT	GGTGCAGGAT	1140
ATCCTGCTGA	TGAAGCAGAA	CAACTTTAAC	GCOGTGCGCT	GTTGCGATTA	TCOGAACCAT	1200
COGCTGTGGT	ACAOGCTGTG	OGACOGCTAC	GGCCTGTATG	TGGTGGATGA	AGCCAATATT	1260
GAAACCCACG	GCTATGGTGC	AATGAATOGT	CTGACOGATG	ATCOGOGCTG	GCTACOGGCG	1320
ATGAGOGAAC	GOGTAAOGCG	AATGGTGCAG	OGOGATOGTA	ATCACCOGAG	TGTGATCATC	1380
TGGTGGCTGG	GGAATGAATC	AGGCCAOGGC	GCTAATCACG	AOGGCTGTGA	TOGCTGGATC	1440
AAATCTGTGG	ATCCTTCCCG	COGGTGCAG	TATGAAGGCG	GOGGAGCOGA	CACCAOGGCC	1500
ACOGATATTA	TTTGGCCOGAT	GTAOGGOGCG	GTCGATGAAG	ACCAGCCCTT	CCOGGCTGTG	1560
COGAAATGGT	CCATCAAAAA	ATGGCTTTTG	CTACCTGGAG	AGACGCGCCC	GCTGATCCCT	1620
TGOGAATAAG	CCCACGOGAT	GGGTAAACAGT	CTTGGGCGTT	TOGCTAAATA	CTGGCAGGCG	1680
TTTGGTCAAT	ATCCCGGTTT	ACAGGGGCGC	TTGGTCTGGG	ACTGGGTGGA	TCAGTGGCTG	1740
ATTAAATATG	ATGAAAACGG	CAACCGGTGG	TOGGCTTACG	GOGGTGATTT	TGGOGATAOG	1800
COGAAOGATC	GCCAGTTCTG	TATGAAOGGT	CTGGTCTTTG	COGACOGCAC	GCOGCATCCA	1860
GOGCTGAOGG	AAGCAAAACA	CCAGCAGCAG	TTTTTCCAGT	TCOGTTTATC	OGGGCAAACC	1920
ATOGAAGTGA	CCAGOGAATA	CCTGTTCCGT	CATAGOGATA	AOGAGCTCCT	GCACTGGATG	1980
GTTGGGCTGG	ATGGTAAAGC	GCTGGCAAGC	GGTGAAGTGC	CTCTGGATGT	CGCTCCACAA	2040
GGTAAACAGT	TGATTGAACT	GCTGAACTA	CCGACGCGG	AGAGGCGCG	GCAACTCTGG	2100
CTCACAGTAC	GCGTAGTGCA	ACOGAACGCG	ACCGCATGGT	CAGAAGCGCG	GCACATCAGC	2160
GCTGGCAGC	AGTGGGCTCT	GGGGGAAAAC	CTCAGTGTGA	OGCTCCCGCG	CGGTCCCGAC	2220
GCCATCCGCG	ATCTGACCAC	CAGOGAAATG	GATTTTGTGA	TOGAGCTGGG	TAATAAGOGT	2280
TGGCAATTTA	ACOGCCAGTC	AGGCTTTCTT	TCACAGATGT	GGATTGGOGA	TAAAAAACAA	2340
CTGCTGACGC	OGCTGOGCGA	TCAGTTTACC	OGTGCACOGC	TGGATAAOGA	CATTGGOGTA	2400
AGTGAAGOGA	CCOGCATTTA	CCCTAAOGCC	TGGGTGGAAC	GCTGGAAGGC	GGGGGGCCAT	2460
TACCAGGCOG	AAGCAGOGTT	GTTGCAGTGC	AOGGCAGATA	CACTTGCTGA	TGOGGTGCTG	2520
ATTAOGACOG	CTCAGOGGTG	GCAGCATCAG	GGGAAAACCT	TATTTATCAG	COGAAAACCC	2580
TACOGGATTG	ATGGTAGTGG	TCAAATGGCG	ATTACOGTTG	ATGTTGAAGT	GGOGAGCGAT	2640
ACACOGCATC	CGGCGGGGAT	TGGCCTGAAC	TGCCAGCTGG	CGCAGGTAGC	AGAGCGGGTA	2700
AACTGGCTCG	GATTAGGGCC	GCAAGAAAAC	TATCCOGACC	GCCTTACTGC	CGCCTGTTTT	2760

```
GACOGCTGGG ATCTGCCATT GTCAGACATG TATACCCCGT AOGTCTTCCC GAGOGAAAAC 2820
GGTCTGOGCT GOGGGAOGOG OGAATTGAAT TATGGCCCAC ACCAGTGGOG OGGOGACTTC 2880
CAGTTCAACA TCAGCOGCTA CAGTCAACAG CAACTGATGG AAACCAGCCA TOGCCATCTG 2940
CTGCAOGOGG AAGAAGGCAC ATGGCTGAAT ATOGAOGGTT TCCATATGGG GATTGGTGGC 3000
GAOGACTOCT GGAGCCOGTC AGTATOGGOG GAATTCCAGC TGAGOGCOGG TOGCTACCAT 3060
TACCAGTTGG TCIGGTGICA AAAATAataa taacogggca ggocatgtct gccogtattt 3120
ogogtaagga aatccattat gtactattta aa 3152
```

In Großbuchstaben ist die DNA-Sequenz für das LacZ-Gen aus Plasmid pMC 1403 dargestellt.

Referenz : Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, M.S. 1980. In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. J. Bacteriol. 143: 971 - 980.

SEQ ID NO:4

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (pMTV1)

SEQUENZLÄNGE:5314 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

AAATTGTAAA	OGTTAATATT	AGACATAATT	TATCCTCAAG	TAAGGGGCOG	AAGCCCTGTC	60
AATTAAAATT	GTTGACCACC	TACATAACCA	AGAOGAGOGC	CTTTAOGCTT	GCCTTTAGTA	120
CCTOGCAAOG	GCTGCGGACG	ACCAGGGOGA	GOGCCAGAAC	GTTTTTTTACC	TTTAGACATT	180
ACATCACTCC	TTCOGCAOGT	AATTTTTTGAC	GCAOGTTTTTC	TTCTGOGTCA	GTAAGAAOGT	240
CAGTGTTC	TGOGGTACA	CGCAAGGTAA	ACGCGAACAA	TTCAGOGGCT	TTAACGGAC	300
GCTOGACOGC	ATTATAATG	TTTTCOGTAA	ATTGAGOGCC	TTCCATGATG	AGACAGGCOG	360
TTTGAAATGTT	GACGGGATGA	ACATAATAAG	CAATGAOGGC	AGCAATAAAC	TCAACAGGAG	420
CAGGAAAGOG	AGGGTATCCC	ACAAAGTCCA	GOGTACCATA	AAOGCAAGCC	TCAACGCAGC	480
GACGAGCAOG	AGAGOGGTCA	GTAGCAATCC	AAACTTTGTT	ACTOGTCAGA	AAATOGAAAT	540
CATCTTCOGT	TAAATCCAAA	ACGGCAGAAG	CCTGAATTCT	AGCTAGAGGA	TCTTTAGCTG	600
TCTTGTTT	CCCAAAGOGC	ATTGCATAAT	CTTCAGGGT	TATGOGTTGT	TCCATACAAC	660
CTCCTTAGTA	CATGCAACCA	TTATCACOGC	CAGAGGTAAA	ATAGTCAACA	OGCAOGGTGT	720
TAGATAITTA	TCCCTTGCGG	TGATAGATTT	AAOGTATGAG	CACAAAAAAG	AAACCATTAA	780
CACAAGAGCA	GCTTGAGGAC	GCAOGTOGCC	TTAAAGCAAT	TTATGAAAAA	AAGAAAAATG	840
AACTTGGCTT	ATCCOCAGGA	TCTGTGCGAG	ACAAGATGGG	GATGGGGCAG	TCAGGOGTTG	900
GTGCTTTATT	TAATGGCATC	AATGCATTAA	ATGCTTATAA	OGCOGCATTG	CTTACAAAAA	960
TTCTCAAAGT	TAGOGTTGAA	GAATTTAGCC	CITCAATOGC	CAGAGAAATC	TAOGAGATGT	1020
ATGAAGOGGT	TAGTATGCAG	CGTCACTTA	GAAGTGAGTA	TGAGTACCCCT	GTTTTTTCTC	1080
ATGTTTCAGGC	AGGGATGTTT	TCACCTAAGC	TTAGAACCTT	TACCAAAGGT	GATGCGGAGA	1140
GATGGGTAAG	CACAACCAAA	AAAGCCAGTG	ATTCTGCATT	CTGGCTTGAG	GTTGAAGGTA	1200
ATTCCATGAC	OGCACCAACA	GGCTCCAAGC	CAAGCTTTCC	TGAOGGAATG	TTAATTCTOG	1260
TTGACCCCTGA	GCAGGCTGTT	GAGCCAGGTG	ATTTCTGCAT	AGCCAGACTT	GGGGGTGATG	1320
AGTTTACCTT	CAAGAAACTG	ATCAGGGATA	GOGGTGAGGT	GTTTTTACAA	CCACTAAACC	1380
CACAGTACCC	AATGATCCCA	TGCAATGAGA	GTTGTTCCGT	TGTGGGGAAA	GTTATCGCTA	1440
GTCAGTGGCC	TGAAGAGACG	TTTGGCTGAT	CGGCAAGGTG	TTCTGGTGGG	OGCATAGCTG	1500
ATAACAATTG	AGCAAGAATC	TTCATOGAAT	TAGGGGAATT	TTCACTCCCC	TCAGAACATA	1560
ACATAGTAAA	TGGATTGAAAT	TATGAAGAAT	GGTTTTTATG	OGACTTACCG	CAGCAAAAAT	1620
AAAGGGAAAG	ATACTTGAAG	ACGAAAGGGC	ATTTTTGTAA	AATTGOGGTT	AAATTTTTGT	1680
TAAATCAGCT	CATTTTTTTAA	CCAATAGGCC	GAAATOGGCA	AAATCCCTTA	TAAATCAAAA	1740
GAATAGACCG	AGATAGGGTT	GAGTGTGTTT	CCAGTTTGGG	ACAAGAGTCC	ACTATTAAAG	1800
AAOGTGGACT	CCAACGTCAA	AGGGOGAAAA	ACOGTCTATC	AGGGOGATGG	CCCACTAOGT	1860
GAACCATCAC	CCTAATCAAG	TTTTTTTGGG	TOGAGGTGCC	GTAAAGCACT	AAATOGGAAC	1920
CCTAAAGGGA	GCCCCOGATT	TAGAGCTTGA	OGGGGAAAGC	OGGOGAACGT	GGGAGAAAG	1980
GAAGGGAAGA	AAGOGAAAGG	AGOGGGOGCT	AGGGOGCTGG	CAAGTGTAGC	GGTCACGCTG	2040
OGCGTAACCA	CCACACCGC	OGCGTTAAT	GOGCOGCTAC	AGGGOGGCTC	CCATTGCGCA	2100
TTGAGGCTAC	GCAACTGTTG	GGAAGGGOGA	TOGGTGGGG	CCTCTTGGCT	ATTACGCCAG	2160
CTGGCGAAGG	GGGGATGTGC	TGCAAGGOGA	TTAGTTGGG	TAAOGOCAGG	GTTTTCCCGAG	2220
TCAOGACGTT	GTAAAAAGAC	GGCCAGTGAA	TTGTAAATAC	ACTCACTATA	GGGCGAATTG	2280
GAGCTCCACC	GOGGTGGOGG	COGCTCTAGT	ATGTGCACT	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	2340
TGCOGCATAG	TTAAGCCAGT	ATATACACTC	OGCTATOGCT	ACGTGACTGG	GTCATGGCTG	2400
OGCCCCGACA	COGCGCAACA	COGCTGACG	OGCCCTGACG	GGCTTGTCTG	CTCCCGGCAT	2460
COGCTTACAG	ACAAGCTGTG	ACOGTCTCOG	GGAGCTGCAT	GTTGTCAGAG	TTTTTACOGT	2520
CATCACOGAA	ACOGOGAGG	CAGTAAGGTC	GGATGCTTTG	TGAGCAATTG	GTCCCTTAAG	2580
TAAGCAATTG	CTGTAAAGTC	GTCAGTGTGC	GGATCACOGC	TTCCAGTAGC	GACAGAAGCA	2640
ATTGATTGGT	AAATTTTOGAG	AGAAAGATOG	OGAGGAAGAT	CAATACATAA	AGAGTTGAAC	2700
TTCTTTGTG	TCTTOGACAT	GGGTAATCCT	CATGTTTGAA	TGGCCCTAGA	GGATCOGGCC	2760
AAGCTTGTCAT	GCCTGCAGGT	OGACTCTAGA	GGATCCCOGA	OGCTOGAOGC	CATTAATAAT	2820
GTTTTCOGTA	AATTCAGOGC	CTTCCATGAT	GAGACAGGCC	GTTTGAATGT	TGACGGGATG	2880

AACATAATAA	GCAATGAOCC	CAGCAATAAA	CTCAACAGGA	GCAGGAAAGC	GAGGGTATCC	2940
CACAAAGTCC	AGOGTACCAT	AAACGCAAGC	CTCAACGCAG	OGACGAGCAC	GAGAGCGGTC	3000
AGTAGCAATC	CAAACCTTGT	TACTCGTCAG	AAAATOGAAA	TCATCTTOGG	TTAAATCCAA	3060
AAOCGCAGAA	GOCTGAATGA	GAATTOGACC	TOGAGGGGGG	GCCCGGTACC	CAGCTTTTGT	3120
TCCCTTTAGT	GAGGGTTAAT	TCCGAGCTTG	GOGTAATCAT	GGTCATAGCT	GTTTCCTGTG	3180
TGAAATTGTT	ATCOGCTCAC	AATTOCACAC	AACATAGGAG	COGGAAGCAT	AAAGTGTAAA	3240
GOCTGGGGTG	CCTAATGAGT	GAGGTAACTC	ACATTAATTG	OGTTGOGCTC	ACTGCCOGCT	3300
TTCCAGTOGG	GAAACCTGTC	GTCGCCAGCTG	CATTAATGAA	TOGGCCAAOG	OGCGGGGAGA	3360
GGOGGTTTGC	GTATTGGGGG	CTCTTCOGCT	TCCTOGCTCA	CTGACTOGCT	GCGCTCGGTC	3420
GTTGGGCTGC	GGOGAGCGGT	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	TAATAOGGTT	ATCCACAGAA	3480
TCAGGGGATA	AOCGAGGAAA	GAACATGTGA	GCAAAAAGGC	AGCAAAAAGC	CAGGAACCGT	3540
AAAAAGCCCG	OGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTCGGCC	CCCCTGACGA	GCATCACAAA	3600
AATOGAOGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	COGACAGGAC	TATAAAGATA	CCAGGCGTTC	3660
CCCCCTGGAA	GCTCCCTOGT	GCGCTCTCCT	GTTCCGACCC	TGCGGCTTAC	OGGATACCTG	3720
TCCGCCTTTC	TCCCTTOGGG	AAGOGTGGOG	CTTTCTCAAT	GCTCAOGCTG	TAGGTATCTC	3780
AGTTGGTGT	AGGTGCTTCG	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	AOGAACCCCC	OGTTACGCCC	3840
GACOGCTGCG	CCTTATCOGG	TAACTATOGT	CTTGAGTCCA	ACCOGGTAAG	ACAOGACTTA	3900
TOGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	OGAGGTATGT	AGGOGGTGCT	3960
ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	GGCTACACTA	GAAGGACAGT	ATTTGGTATC	4020
TGOGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTOGGA	AAAAGAGTTG	GTAGCTCTTG	ATCOGGCAAA	4080
CAAACCACCG	CTGGTAGOGG	TGGTTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	GCGCAGAAAA	4140
AAAGGATCTC	AAGAAGATCC	TTTGATCTTT	TCTACGGGGT	CTGAOGCTCA	GTGGAAOGAA	4200
AACTCAOGTT	AAGGGATTTT	GGTCATGAGA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	CTAGATCCTT	4260
TTAAATTAAA	AATGAAGTTT	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC	TTGGTCTGAC	4320
AGTTACCAAT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT	ATCTCAGOGA	TCTGTCTATT	TOGTTTCATC	4380
ATAGTTGCOCT	GACTGCCCGT	OGTGTAGATA	ACTAOGATAC	GGGAGGGCTT	ACCATCTGGC	4440
CCCAGTGCTG	CAATGATACC	GOGAGACCCA	OGCTCACOGG	CTCCAGATTT	ATCAGCAATA	4500
AACCAGCCAG	COGGAAGGGC	OGAGOGCAGA	AGTGGTCCTG	CAACTTTTATC	OGCTCCATC	4560
CAGTCTATTA	ATTGTTGCOG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	OGCCAGTTAA	TAGTTTGOGC	4620
AAOGTTGTTG	CCATTGCTAC	AGGCATOGTG	GTGTCAOGCT	OGTGGTTTGG	TATGGCTTCA	4680
TTCAGCTCOG	GTTCCCAAOG	ATCAAGGOGA	GTTACATGAT	CCCCCATGTT	GTGAAAAAAA	4740
GOGGTAGCT	CCTTOGGTCC	TCCGATCGTT	GTCAGAAGTA	AGTTGGCOGC	AGTGTATATCA	4800
CTCATGCTTA	TGGCAGCACT	GCATAATTCT	CTTACTGTCA	TGCCATCOGT	AAGATGCTTT	4860
TCTGTGACTG	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGOG	GCGACOGAGT	4920
TGCTCTTGCC	OGGOGTCAAT	ACGGGATAAT	ACOGOGCCAC	ATAGCAGAAC	TTTTAAAAGTG	4980
CTCATCATTTG	GAAAAOGTTC	TTGGGGGOGA	AAACTCTCAA	GGATCTTACC	GCTGTTGAGA	5040
TCCAGTTGGA	TGTAACCCAC	TOGTGCACCC	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	TACTTTTACC	5100
AGOGTTTCTG	GGTGAGCAAA	AACAGGAAGG	CAAAATGCOG	CAAAAAAGGG	AATAAGGGOG	5160
ACACGGAAAT	GTTGAATACT	CATACTCTTC	CTTTTTCAAT	ATTATTGAAG	CATTTATCAG	5220
GGTTATTGTC	TCATGAGOGG	ATACATATTT	GAATGTATTT	AGAAAAATAA	ACAAATAGGG	5280
GTTCCOGGCA	CATTTCCCCG	AAAAGTGCCA	CCTG			5314

SEQ ID NO:5

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (pML1)

SEQUENZLÄNGE:7641 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

GACGCOGGGC	AAGAGCAACT	CGGTGCGCGC	ATACACTATT	CTCAGAATGA	CTTGTTTGAG	60
TACTCACCAG	TCACAGAAAA	GCATCTTACG	GATGGCATGA	CAGTAAGAGA	ATTATGCAGT	120
GCTGCCATAA	CCATGAGTGA	TAACACTGCG	GCCAACCTTAC	TTCTGACAAC	GATCGGAGGA	180
COGAAGGAGC	TAACCGCTTT	TTTGACACAAC	ATGGGGGATC	ATGTAACCTG	CCTTGATCGT	240
TGGGAACCGG	AGCTGAATGA	AGCCATACCA	AACGAAGAGC	GTGACACCAC	GATGCGCTGCA	300
GCAATGGCAA	CAACGTTGCG	CAAACCTATTA	ACTGGCGAAC	TACTTACTCT	AGCTTCCCGG	360
CAACAATTAA	TAGACTGGAT	GGAGGCGGAT	AAAGTTGCAG	GACCACTTCT	GCGCTCGGCC	420
CTTCGGGCTG	GCTGGTTTAT	TGCTGATAAA	TCTGGAGCOG	GTGAGCGTGG	GTCTCGCGGT	480
ATCATTCGAG	CACTGGGGCC	AGATGGTAA	CCCTCCCGTA	TOGTAGTTAT	CTACACGACG	540
GGGAGTCAG	CAACTATGGA	TGAAOGAAT	AGACATATG	CTGAGATAGG	TGCCTCACTG	600
ATTAAGCATT	GGTAACTGTC	AGACCAAGTT	TACTCATATA	TACTTTAGAT	TGATTTAAAA	660
CTTCATTTTT	AATTTAAAAG	GATCTAGGTG	AAGATCCCTT	TTGATAATCT	CATGACCAAA	720
ATCCCTTAAC	GTTGAGTTTT	GTTCCACTGA	GCGTCAGACC	CTTAATAAAG	ATGATCTTCT	780
TGAGATCGTT	TTGGTCTGCG	CGTAATCTCT	TGCTCTGAAA	AOGAAAAAAC	CGCCTTGCGC	840
GGCGGTTTTT	CGAAGGTTCT	CTGAGCTACC	AACCTCTTTGA	ACOGAGGTAA	CTGGCTTGGA	900
GGAGCGCAGT	CACCAAACT	TGTCTTTTCA	GTTTAGCCTT	AACOGGCGCA	TGACTTCAAG	960
ACTAACTCCT	CTAAATCAAT	TACCACTGGC	TGCTGCGAGT	GGTGCTTTTG	CATGCTTTTC	1020
CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGGA	TAAGGCGCAG	CGGTGGACT	GAAOOGGGGG	1080
TTCTGTCATA	CAGTCCAGCT	TGGAGOGAAC	TGCTTACCGG	GAAGTGAGTG	TCAGGCGTGG	1140
AATGAGACAA	AOCGCGCCAT	AACAGOGGAA	TGACACCGGT	AAACOGAAAG	GCAGGAACAG	1200
GAGAGCGCAC	GAGGGAGCOG	CCAGGGGAAA	CGCCTGGTAT	CTTTATAGTC	CTGTGCGGTT	1260
TOGCCACCAC	TGATTTGAGC	GTCAGATTTT	GTTGATGCTG	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	1320
GAAAAAOGGC	TTTGCGCGCG	CCCTCTCACT	TCCCTGTATA	GTATCTTCTT	GGCATCTTCC	1380
AGGAAATCTC	CGCCCGGTTT	GTAAGCCATT	TCCGCTCGCC	GCAGTGAAC	GACCGAGCGT	1440
AGCGAGTCAG	TGAGCGAGGA	AGCGGAATAT	ATCCTGTATC	ACATATTCTG	CTGACGCAAC	1500
GGTGCAGCCT	TTTTTCTCCT	GCCACATGAA	GCACTTCACT	GACACCTCA	TCAGTGCCAA	1560
CATAGTAAGC	CAGTATACAC	TCGCTAGCG	CTGAGGCTCT	CCTOGTGAAG	AAGGTGTTGC	1620
TGACTCATAC	CAGGCCGTGA	TGCGCCATC	ATCCAGCCAG	AAAGTGAGGG	AGCCAOGGTT	1680
GATGAGAGCT	TTGTGTAGG	TGGAACAGTT	GGTGATTTTG	AACCTTTGCT	TTGCCAOGGA	1740
AOGGTCTGCG	TTGTGCGGAA	GATGCGTGAT	CTGATCCCTT	AACCTAGCAA	AAGTTGCGAT	1800
TATTCACAA	AGCCACGTTG	TGTCTCAAAA	TCTCTGATGT	TACATTGCAC	AAGATAAAAA	1860
TATATCATCA	TGAACAATAA	AACTGTCTGC	TTACATAAAC	AGTAATACAA	GGGGTGTAT	1920
GAGCCATATT	CAACGGGAAA	CGTCTTGCTC	GAGGCGCGCA	TTAAATTCCA	ACATGGATGC	1980
TGATTTATAT	GGGTATAAAT	GGGCTGCGCA	TAATGTGGGG	CAATCAGGTG	CGACAATCTA	2040
TOGATTGTAT	GGGAAGCCCG	ATGCGCCAGA	GTTGTTTCTG	AAACATGGCA	AAGGTAGCGT	2100
TGCCAATGAT	GTTACAGATG	AGATGGTCAG	ACTAACTGG	CTGAOGGAAT	TTATGCGCTT	2160
TCOGACCATC	AAGCATTTTA	TCGCTACTCC	TGATGATGCA	TGGTTACTCA	CCACTGCGAT	2220
CCCGGGGAAA	ACAGCATTCC	AGGTATTAGA	AGAATATCCT	GATTCAGGTG	AAAATATTGT	2280
TGATGCGCTG	GCAGTGTTC	TGCGCGGGTT	GCATTCGATT	CCTGTTTGT	ATTGTCCTTT	2340
TAACAGOGAT	CGGTATTTTC	GTCTGCTCA	GGCGCAATCA	CGAATGAATA	ACGGTTTGGT	2400
TGATGCGAGT	GATTTTGTATG	ACGAGCGTAA	TGGCTGGCGT	GTTGAACAAG	TCTGGAAAGA	2460
AATGCATAAG	CTTTTGCCAT	TCTCACOGGA	TTCACTGCTC	ACTCATGGTG	ATTTCTCACT	2520
TGATAACCTT	ATTTTGTACG	AGGGGAAATT	AATAGGTTGT	ATTGATGTTG	GACGAGTCGG	2580
AATGCGAGAC	CGATACCAGG	ATCTTGCCAT	CCTATGGAAC	TGCGTCGGTG	AGTTTCTCTC	2640
TTCAATTACAG	AAACGGCTTT	TTCAAAAATA	TGGTATTGAT	AATCCTGATA	TGAATAAATT	2700
CGAGTTTCAT	TTGATGCTCG	ATGAGTTTTT	CTAATCAGAA	TTGGTTAATT	GGTTGTAAACA	2760

ERSATZBLATT

CTGGCAGAGC	ATTACGCTGA	CTTGAOGGGA	CGGOGGCTTT	GTGAATAAAA	TOGAACITTTT	2820
GCTGAGTTGA	AGGATCAGAT	CAOGCATCTT	CCCGACAACG	CAGACOGTTC	CGTGGCAAAG	2880
CAAAAGTTCA	AAATCAACAA	CTGGTCCACC	TACAACAAAG	CTCTCATCAA	COGTGGCTCC	2940
CTCACTTTCT	GGCTGGATGA	TGGGGOGATT	CAGGCGTGGT	ATGAGTCAGC	AACACCTTCT	3000
TCAOGAGGCA	GACCTCAGCG	CTCAAAGATG	CAGGGGTAAA	AGCTAACOGC	ATCTTTACOG	3060
ACAAGGCATC	CGGCAGTTCA	ACAGATOGGG	AAGGGCTGGA	TTTGCTGAGG	ATGAAGGTGG	3120
AGGAAGGTGA	TGTCATTCTG	GTGAAGAAGC	TOGACOGTCT	TGGCOGOGAC	ACOGCOGACA	3180
TGATCCAACT	GATAAAAGAG	TTTGATGCTC	AGGGTGTAGC	GGTTOGGTTT	ATTGACCAOG	3240
GGATCAGTAC	OGAOGGTGAT	ATGGGGCAAA	TGGTGGTCAC	CATCCTGTGG	GCTGTGGCAC	3300
AGGCTGAACG	COGGAGGATC	CAGTTTOGATG	TAAOCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	3360
GCATCTTTTA	CTTTCAACCAG	OGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCOGCA	3420
AAAAAGGGAA	TAAGGGOGAC	ACGGAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT	3480
TATTGAAGCA	TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT	ACATATTTGA	ATGTATTTAG	3540
AAAAATAAAC	AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTTCCCGGAA	AAGTGCCACC	TGAOGTCTAA	3600
GAAACCATTA	TTATCATGAC	ATPAACCTAT	AAAAATAGGC	GTATCAOGAG	GCCCTTTGGT	3660
CTTCAAGTAT	CTTTCCCTTT	ATTTTGTCTG	CGGTAAGTGG	CATAAAAACC	ATTCTTCATA	3720
ATTCAATCCA	TTTACTATGT	TATGTTCTGA	GGGGAGTGAA	AATTCCOCTA	ATTGATGAA	3780
GATTCTTTGCT	CAATTGTTAT	CAGCTATGOG	COGACCAGAA	CACCTTGOOG	ATCAGCCAAA	3840
CGTCTCTTCA	GGCCACTGAC	TAGOGATAAC	TTTTCCCAACA	ACGGAACAAC	TCTCATTGCA	3900
TGGGATCATT	GGGTACTGTG	GGTTTAGTGG	TTGTAAAAAC	ACCTGACOGC	TATCCCTGAT	3960
CAGTTTCTTG	AAGGTAAACT	CATCACCCCC	AAGTCTGGCT	ATGCAGAAAT	CACCTGGCTC	4020
AACAGCCTGC	TCAGGGTCAA	OGAGAATTAA	CATTCOGTCA	GGAAAGCTTG	GCTTGGAGCC	4080
TGTTGGTGOG	GTGATGGAAT	TACCTTCAAC	CTCAAGCCAG	AATGCAGAAT	CACCTGGCTT	4140
TTTGGTTGTG	CTTACCCATC	TCTCCGCATC	ACCTTTGGTA	AAGGTTCTAA	GCTTAGGTGA	4200
GAACATCCCT	GCCTGAACAT	GAGAAAAAAC	AGGGTACTCA	TACTCACTTC	TAAGTGAOGG	4260
CTGCATACTA	ACOGCTTCAT	ACATCTCGTA	GATTTCTCTG	GOGATTGAAG	GGCTAAATTC	4320
TTCAACGCTA	ACTTTGAGAA	TTTTTGTAAAG	CAATGCGGOG	TTATAAGCAT	TTAATGCATT	4380
GATGCCATTA	AATAAAGCAC	CAACGCCTGA	CTGCCCCATC	CCCATCTTGT	CTGOGACAGA	4440
TTCTCTGGGAT	AAGCCAAGTT	CATTTTCTTT	TTTTTTCATAA	ATTGCTTTAA	GGOGAOGTGC	4500
GTOCTCAAGC	TGCTCTTGIG	TTAATGGTTT	CTTTTGTGTG	CTCATAOGTT	AAATCTATCA	4560
COGCAAGGGA	TAAATATCTA	ACACOGTGGG	TGTTGACTAT	TTTACCTCTG	CGGGTGATAA	4620
TGGTTGCGAT	TACTAAGGAG	GTGTATGGA	ACAACGCATA	ACCTGAAAG	ATTATGCAAT	4680
GOGCTTTGGG	CAACCAAGA	CAGCTAAAGA	TCCCTtagCT	AGAATTCAGG	CTTCTGCGGT	4740
TTTGGATTTA	ACOGAAGATG	ATTTGATTTT	TCTGAOGAGT	AACAAAGTTT	GGATTGCTAC	4800
TGACCGCTCT	CGTGCCTGTC	GCTGOGTTGA	GGCTTGOGTT	TATGGTACGC	TGGACTTTGT	4860
GGGATACCCCT	OGCTTTCCCTG	CTCCTGTGTA	GTTTATTGCT	GCOGTCAATTG	CTTATTATGT	4920
TCATCCCGTC	AACATTCAAA	CGGCTGTGCT	CATCATGGAA	GGCGCTGAAT	TTACGGAAAA	4980
CATTATTAAAT	GGGTGOGAGC	GTCOGGTTAA	AGOOGCTGAA	TTGTTGOGGT	TTACCTTGOG	5040
TGTAOGGCGA	GGAAACACTG	AOGTTCTTAC	TGAOGCAGAA	GAAAAOGTGC	GTCAAAAATT	5100
AOGTGOGGAA	GGAGTGATGT	AATGTCTAAA	GGTAAAAAAC	GTCTGGOGC	TOGCCCTGGT	5160
OGTGOGCAGC	OGTTGOGAGG	TACTAAAGGC	AAGOGTAAAG	GOGCTOGTCT	TTGGTATGTA	5220
GGTGGTCAAC	AATTTTAATT	GCAGGGGCTT	CGGCCOCTTA	CTTGAGGATA	AATTATGTCT	5280
AATATTCAAA	CTGGGCGCGA	GOGTATGCOG	CATGACCTTT	CCCATCTTGG	CTTCCCTTGT	5340
GGTCAGATTG	GTOGTCTTAT	TACCATTTCA	ACTACTCOGG	TTATOGCTGG	OGACTCCCTC	5400
GAGATGGACG	COGTGGGCGC	TCTCOGTCTT	TCTCCATTGC	GTOGTGGCCT	TGCTATTGAC	5460
TCTACTGTAG	ACATTTTATAC	TTTTTATGTC	CCTCATOGTC	AOGTTTATGG	TGAACAGTGG	5520
ATTAAGTTCA	TGAAGGATGG	TGTTAATGCC	ACTCCTCTCC	OGACTGTAA	CACTACTGGT	5580
TATATTGACC	ATGCOGCTTT	TCTTGGCAOG	ATTAACCCCTG	ATACCAATAA	AATCCCTAAG	5640
CATTTGTTTC	AGGGTTAATT	GAATATCTAT	AACAACCTATT	TTAAAGOGCC	GTGGATGCOCT	5700
GACOGTACOG	AGGCTAACC	TAATGAGAAT	TCTCATGTTT	GACAGCTTAT	CATOGATAAG	5760
CTTTAATGOG	GTAGTTTATC	ACAGTTAAAT	TGCTAACGCA	GTCAGGCACC	GCTGATGAAA	5820
TCTAACAAATG	OGCTCATOGT	CATCCTOGGC	ACOGTCAOCC	TGGATGCTGT	AGGCATAGGC	5880
TTGGTTATGC	OGGTACTGCC	GGGCTCTTIG	OGGGATATOG	TCCATTCCGA	CAGCATOGCC	5940
AGTCACTATG	GOGTCTGCT	AGOGCTATAT	GOGTTGATGC	AATTTCTATG	OGCACCOGTT	6000
CTCGGAGCAC	TGTCOGACOG	CTTTGGCOGC	OGCCOAGTCC	TGCTOGCTTC	GCTACTTGGA	6060
GCCACTATOG	ACTACOGGAT	CATGGOGACC	ACACCOGTCC	TGTGGATCOG	GATCAGCAGG	6120
TGGAAGAGGG	ACTGGATTCC	AAAGTTCTCA	ATGCTGCTTG	CTGTTCTTGA	ATGGGGGGTC	6180

GTGACGACG	ACATGGCTCG	ATTGGGOGGA	CAAGTTGCTG	CGATTCTCAC	CAATAAAAAA	6240
OGCCCGGCG	CAACOGAGCG	TTCTGAACAA	ATCCAGATGG	AGTTCTGAGG	TCATTACTGG	6300
ATOGCOGGAT	CTGAATTGCT	ATGTTTAGTG	AGTTGTATCT	ATTTATTTTT	CAATAAATAC	6360
AATTGGTTAT	GTGTTTTGGG	GGOGATCGTG	AGGCAAAGAA	AACCCGGGCG	TGAGGCGCGA	6420
AGCATAAAGT	GTAAAGCCTG	GGGTGCCTAA	TGAGTGAGCT	AACTCACATT	AATTGCGTTG	6480
OGCTCACTGC	COGCTTTCCA	GTOGGGAAAC	CTGTGTGTCC	AGCTGCATTA	ATGAATCGGC	6540
CAACOGGCG	GGAGAGGCGG	TTTGGGTATT	GGGCGCCAGG	GTGGTTTTTC	TTTTCAACCAG	6600
TGAGACGGGC	AACAGCTGAT	TGCCCTTCAC	OGCTTGGCCC	TGAGAGAGTT	GCAGCAAGCG	6660
GTCCACGCTG	GTITGCCCCA	GCAGGCGAAA	ATCCTGTITG	ATGGTGGTITG	ACGGCGGGAT	6720
ATAACATGAG	CTGTCTTGGG	TATOGTGTGA	TCCCACTACC	GAGATATCOG	CACCAACGCG	6780
CAGCCCGGAC	TOGGTAATGG	OGCGCATTCG	GCCCAGCGCC	ATCTGATOGT	TGGCAACCAG	6840
CATOGCAGTG	GGAAOGATGC	CCTCATTCAG	CATTTGCATG	GTITGTTGAA	AACCGGACAT	6900
GGCACTCCAG	TOGCCTTCCC	GTTCOGCTAT	OGGCTGAATT	TGATTGOGAG	TGAGATATTT	6960
ATGOCAGCCA	GCCAGAOGCA	GAOGGCGCGA	GACAGAACTT	AATGGGCCCC	CTAACAGCGC	7020
GATTTGCTGG	TGACCCAATG	OGACCAGATG	CTCCAOGCCC	AGTGGGTAC	OGTCTTCATG	7080
GGAGAAAATA	ATACTGTTGA	TGGGTGTCTG	GTCAGAGACA	TCAAGAAATA	ACGCGGAAC	7140
ATTAGTGCAG	GCAGCTTCCA	CAGCAATGGC	ATCCTGGTCA	TCCAGCGGAT	AGTTAATGAT	7200
CAGCCCACTG	ACGCGTTGCG	OGAGAAGATT	GTGCACCGCC	GCTTTACAGG	CTTOGAOGCC	7260
GCTTGGTTCT	ACCATOGACA	CCACCAOGCT	GGCACCCAGT	TGATCGGCGC	GAGATTTAAT	7320
OGCOGCGACA	ATTTGOGACG	GOGCGTGCAG	GGCCAGACTG	GAGGTGGCAA	OGCCAATCAG	7380
CAACGACTGT	TTGCCCGCCA	GTITGTTGTG	CAOGCGGTTG	GGAATGTAAT	TCAGCTCCGC	7440
CATOGCOGCT	TOCACTTTTT	CCOGCGTTTT	OGCAGAAACG	TGGCTGGCCT	GGTTCAACCAC	7500
GOGGGAACG	GTCTGATAAG	AGACACCGGC	ATACTCTGCG	ACATOGTATA	ACGTTACTGG	7560
TTTCACATTC	ACCACCCTGA	ATTGACTCTC	TTCOGGCGCT	ATCATGCCAT	ACOGCGAAAG	7620
GTTTIGOGCC	ATTGATGGT	G				7641

SEQ IDNO:6

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz
SEQUENZLÄNGE:3681 Basenpaare

(pKSEL5)

STRANGFORM:Einzelstrang

AAATTGTAAA	CGTTAATATT	TTGTTAAAAT	TCOGGTTAAA	TTTTTGTTAA	ATCAGCTCAT	60
TTTTTAACCA	ATAGGCOGAA	ATOGGCAAAA	TCCCTTATAA	ATCAAAAGAA	TAGACOGAGA	120
TAGGGTTGAG	TGTTGTTCCA	GTTTGGAACA	AGAGTCCACT	ATTAAAGAAC	GTGGACTCCA	180
AOGTCAAAGG	GOGAAAAACC	GTCTATCAGG	GOGATGGCCC	ACTACGTGAA	CCATCACCCCT	240
AATCAAGTTT	TTTGGGGTGG	AGGTGCGGTA	AAGCACTAAA	TOGGAACCCCT	AAAGGGAGCC	300
CCOGATTTAG	AGCTTGAOCC	GGAAAGCOGG	OGAAOCTGGC	GAGAAAGGAA	GGGAAGAAAG	360
OGAAAGGAGC	GGGOGCTAGG	GOGCTGGCAA	GTGTAGOGGT	CACGCTGOGC	GTAACCAACA	420
CACCOGCOGC	GCTTAATGCG	COGCTACAGG	GOGOGTCCCA	TTOGCCATTTC	AGGCTACGCA	480
ACTGTTGGGA	AGGGOGATOG	GTGOGGGCCT	CTTOGCTATT	ACGCCAGCTG	GOGAAGGGGG	540
GATGTGCTGC	AAGGOGATTA	AGTTGGGTAA	OGCCAGGGTT	TTCCCAAGTCA	OGAOGTTGTA	600
AAOAGACGGC	CAGTGAATTG	TAATAOACT	CACTATAGGG	OGAATTGGAG	CTCCACCGCG	660
GTGGOGGCOG	CTCTAGTATG	GTGCACTCTC	AGTACAATCT	GCTCTGATGC	OGCATAGTTA	720
AGCCAGTATA	TACACTCOGC	TATOGCTAOG	TGACTGGGTC	ATGGCTGOGC	CCOGACACCC	780
GCCAACACCC	GCTGACOGGC	CCTGACGGGC	TTGTCTGCTC	COGGCATCOG	CTTACAGACA	840
AGCTGTGACC	GTCTCOGGGA	GCTGCAATGG	TCAGAGGTTT	TCACOGTCAT	CACOGAAACG	900
COGAGGCGAG	TAAGGTGGGA	TGCTTTTGTA	GCAATTGCTC	OCTTAAAGTAA	GCAATTGCTG	960
TAAAGTGGTC	ACTGTGCGGA	TCACCGCTTC	CAGTAGOGAC	AGAAGCAATT	GATTGGTTAAA	1020
TTTOGAGAGA	AAGATOGCGA	GGAAGATCAA	TACATAAAGA	GTTGAACCTC	TTTGTGTCT	1080
TOGACATGGG	TAATCCTCAT	GTTTGAATGG	CCCTAGAGGA	TCOGGCCAAG	CTTGCAATGCC	1140
TGCAGGTGGA	CTCTAGAGGA	TCCCOGAOCC	TOGAOGCCAT	TAATAATGTT	TTCOGTAAAT	1200
TCAGOGCCTT	CCATGATGAG	ACAGGCOGTT	TGAATGTTGA	OGGGATGAAC	ATAATAAGCA	1260
ATGACGGCAG	CAATAAACTC	AACAGGAGCA	OGAGCAOGAG	AGOGGTCAGT	AGCAATCCAA	1320
GTACCATAAA	OGCAAGCCTC	AACAGCAGGA	OGAGCAOGAG	AGOGGTCAGT	AGCAATCCAA	1380
ACTTTGTTAC	TOGTCAGAAA	ATOGAAATCA	TCTTOGGTTA	AATCCAAAAC	GGCAGAAGCC	1440
TGAATGAGAA	TTOGACCTCG	AGGGGGGGCC	OGGTACCCAG	CTTTTGTTC	CTTTAGTGAG	1500
GGTTAAATTCC	GAGCTTGGGG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	1560
OGCTCACAAT	TCCACACAAC	ATAGGAGCOG	GAAGCATAAA	GTGTAAAGCC	TGGGGTGCCT	1620
AATGAGTGAG	GTAACTCACA	TTAATTGOGT	TGOGCTCACT	GCCCGCTTTC	CAGTOGGGAA	1680
ACCTGTGGTG	CCAGCTGCAT	TAATGAATOG	GCCAAOGOGC	GGGGAGAGGC	GGTTTGGGTA	1740
TTGGGGGCTC	TTCOGCTTCC	TOGCTCACTG	ACTOGCTGOG	CTOGGTGCTT	OGGCTGOGGC	1800
GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGOGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	1860
CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACOGTAAA	AAGGCOGOGT	1920
TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTOGGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAT	OGAOGCTCAA	1980
GTCAGAGGTG	GOGAAACCOG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGOGTTCCCC	CCTGGAAGCT	2040
CCCTOGTGGG	CTCTCCGTGT	COGACCCCTG	OGCTTACOGG	ATACCTGTCC	GCCCTTCTCC	2100
CTTOGGGAAG	OGTGGOGCTT	TCTCAATGCT	CAOGCTGTAG	GTATCTCAGT	TOGGTGTAGG	2160
TOGTTOGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCAOG	AACCCCCOGT	TCAGCCOGAC	CGCTGOGCCT	2220
TATCOGGTAA	CTATOGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATOG	CCACTGGCAG	2280
CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGOGA	GGTATGTAGG	OGGTGCTACA	GAGTCTTTGA	2340
AGTGGTGGCC	TAACAGGATT	TACACTAGAA	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	2400
AGCCAGTTAC	CTTOGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	OGGCAAAACA	ACCACOGCTG	2460
GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTG	TGCAAGCAGC	AGATTACOGG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	2520
AAGATCCCTT	GATCTTTTCT	AOGGGTCTG	AOGCTCAGTG	GAAOGAAAAC	TCAOGTTAAG	2580
GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTAAAAAT	2640
GAAGTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	2700

TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGOGATCT	GTCATATTTC	TTCATCCATA	GTTGCGTGAC	2760
TGCCCGTGGT	GTAGATAACT	ACGATAOGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	2820
TGATACCGCG	AGAOCCACGC	TCACOGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	2880
GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAAAT	2940
GTTGCGCGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTGCG	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	3000
TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCAOGCTGGT	OGTTTGGTAT	GGCTTCATTG	AGCTCCGGTT	3060
CCCAACGATC	AAGGOGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	AAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	3120
TOGGTCCCTC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCOGCAGT	GTTATCACTC	ATGCTTATGG	3180
CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCATGC	CATCOGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	3240
AGTACTCAAC	CAAGTCATTG	TGAGAATAGT	GTATGOGGCG	ACOGAGTTGC	TCTTGCCCGG	3300
OGTCAATAAG	GGATAATACC	GOGCCACATA	GCAGAACITT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	3360
AAOGTTCTTC	GGGGGCAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTGATGT	3420
AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTTCTGGGT	3480
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCOGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	3540
GAATACTCAT	ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATGTCTCA	3600
TGAGOGGATA	CATATTIGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	COGCGCACAT	3660
TTCCCGGAAA	AGTGCCACCT	G				3681

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Trägergebundenes rekombinantes Protein erhältlich durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens ein hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie für das rekombinante Protein kodiert und eines Gens, das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen, für ein lytisch wirkendes Toxinreleasegen oder für lytisch wirkende Teilsequenzen davon kodiert, und Gewinnung des trägergebundenen rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe.
2. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomäne eine alphahelicale Struktur besitzt und aus 14 bis 20 Aminosäuren besteht, die N- und C- terminal von je 2 bis 30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein kann.
3. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein mindestens eine weitere Proteindomäne enthält, die aus 10 bis 16 Aminosäuren besteht und eine β -Faltblatt-Sekundärstruktur besitzt.
4. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomäne, die Aminosäuren 1 bis 54 aus dem Protein E des Phagen Φ X174, die Aminosäuren 21 bis 75 aus dem Protein L des Phagen MS2 und/oder eine Aminosäuresequenz, die aus diesen Sequenzen durch Aminosäureaustausch erhältlich ist und eine analoge Protein-Sekundärstruktur besitzt, enthält.

5. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomänen und das rekombinante Protein durch eine hydrophile Aminosäuresequenz mit 2 bis 100 Aminosäuren und ungeordneter Sekundärstruktur verbunden sind.
6. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein eine antigene Struktur aufweist.
7. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß an das rekombinante Protein ein nicht kovalent bindender Bindungspartner für dieses Protein, an dem gegebenenfalls noch weitere Substanzen kovalent oder nicht kovalent gebunden sind, gebunden ist.
8. Trägergebundenes Protein nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein Streptavidin oder Avidin ist.
9. Trägergebundenes Protein nach den Ansprüchen 7 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß der nicht kovalente Bindungspartner ein biotinyliertes Antigen ist.
10. Rekombinante DNA, die eine erste DNA-Sequenz (DNA-Targetsequenz), welche für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne codiert, eine zweite DNA-Sequenz (DNA-Proteinsequenz), die für ein rekombinantes Protein kodiert, sowie eine unter

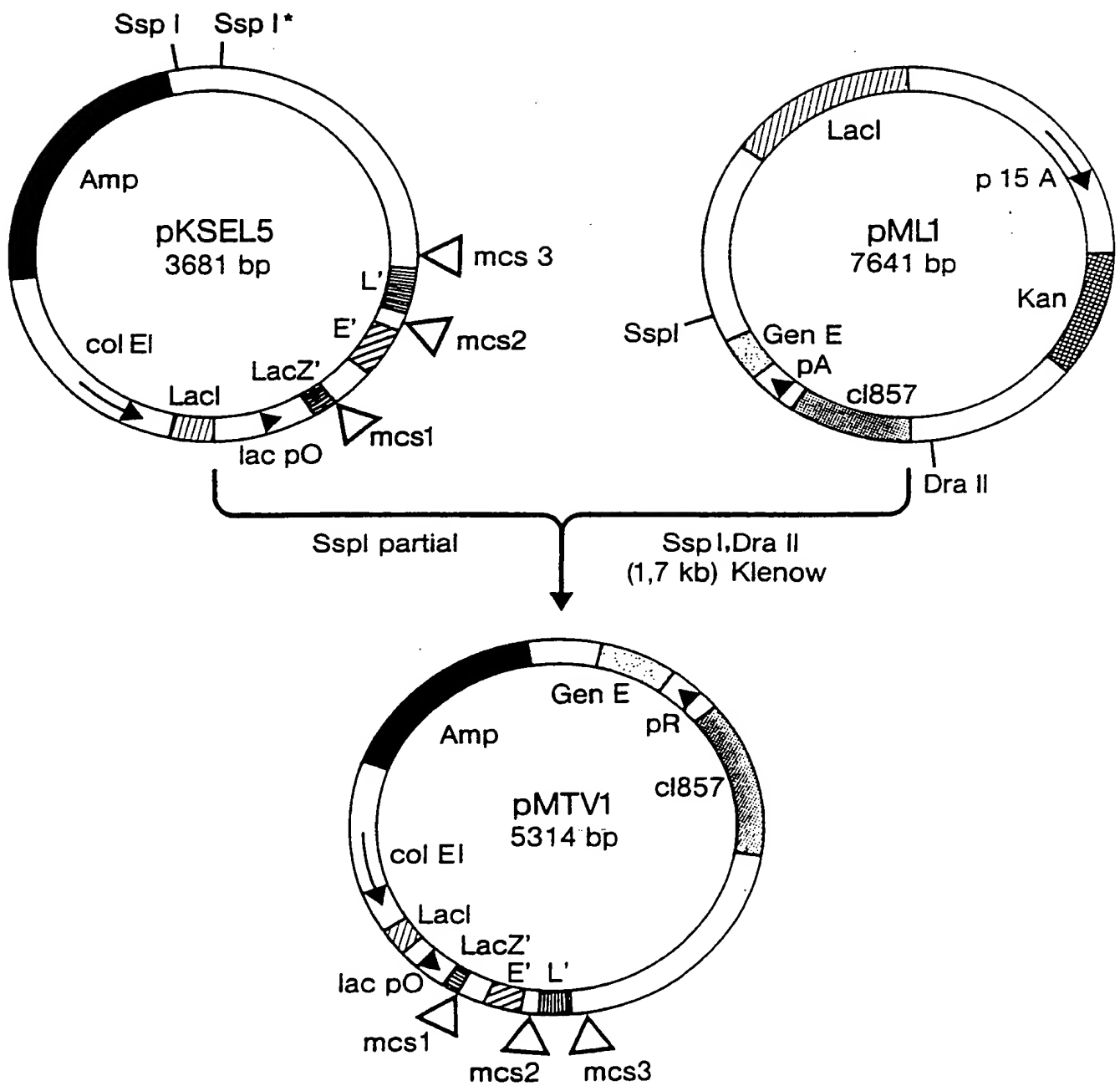
davon getrennter Kontrolle stehenden DNA-Sequenz (DNA-Lyseggen), die für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-release-Gen oder für deren lytisch wirkenden Teile kodiert, enthält.

11. Verfahren zur Herstellung eines trägergebundenen rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß in gramnegativen Bakterien ein Fusionsprotein, welches mindestens eine hydrophobe nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie ein rekombinantes Protein enthält und ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxinrelease Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon exprimiert werden und das trägergebundene rekombinante Protein aus der Kulturbrühe gewonnen wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein weiteres Gen eines rekombinanten Proteins exprimiert wird.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 11 oder 12 dadurch gekennzeichnet, daß bei der Kultivierung die Aktivität des lytischen Membranproteins inhibiert oder die Expression des lytisch wirkenden Membranproteins oder Toxingens reprimiert wird und zu einem gewünschten Zeitpunkt die Inhibierung oder Repression aufgehoben wird.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 11 - 13 dadurch gekennzeichnet, daß das trägergebundene Protein mit einem gegebenenfalls derivatisierten Bindungspartner für das trägergebundene Protein inkubiert und das entstandene trägergebundene Konjugat isoliert wird.

15. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem trägergebundenen Protein nach den Ansprüchen 1 bis 9 immunisiert wird und die Antikörper aus dem Serum oder der Milz gewonnen werden.
16. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, daß B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agenzien, mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert werden, die gewünschte Antikörper produzierende Zelllinie kloniert und kultiviert wird und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die Antikörper gewonnen werden.
17. Verwendung der trägergebundenen Proteine nach den Ansprüchen 1 - 9 zur Herstellung von Vakzinen.
18. Vakzin, erhältlich nach den Ansprüchen 1 - 9.

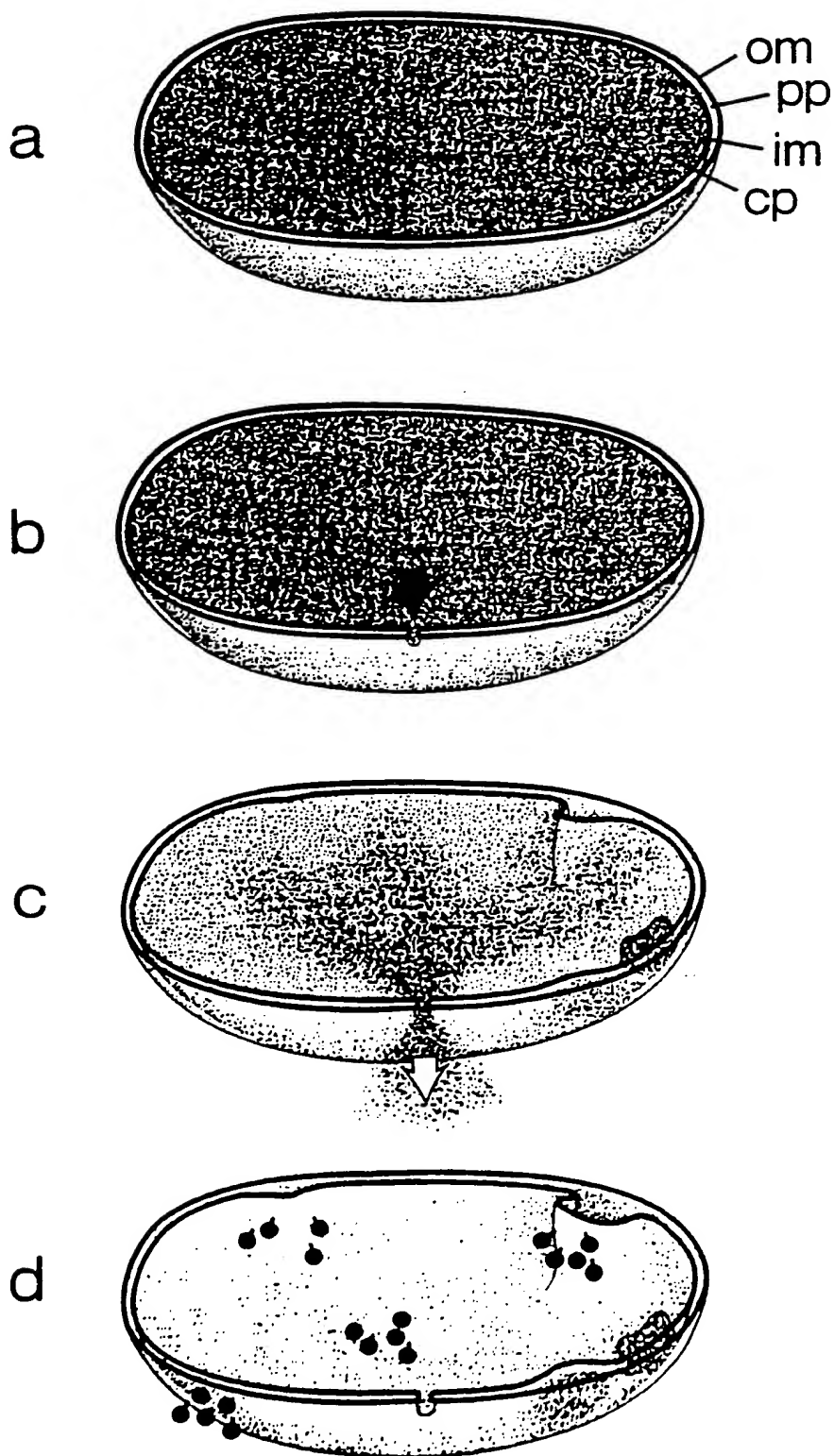
1/2

Fig. 1



2/2

Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/EP 91/00308**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ C 12 N 15/62, A 61 K 39/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵	C 12 N, A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 November 1988 see the whole document (cited in the application)	1, 4, 10, 11, 13
A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY.LTD) 5 November 1987 see claims 1-3, 17-21, 37, 38	
P, X	Res. Microbiol., vol. 141, No. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", pages 1005-1007	1-6, 10-13, 15-18
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
13 May 1991 (13.05.91)		28 June 1991 (28.06.91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9100308

SA 44507

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 25/06/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0291021	17-11-88	DE-A- 3715840	01-12-88
		JP-A- 63287489	24-11-88

WO-A- 8706590	05-11-87	EP-A- 0267204	18-05-88
		JP-T- 1500117	19-01-89
		AU-A- 7351087	24-11-87
		ZA-A- 8702795	07-10-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 91/00308**

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁵ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.⁵ C 12 N 15/62, A 61 K 39/00														
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; padding-right: 20px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 20%; border: none;">Klassifikationssystem</td> <td style="border: none;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">C 12 N, A 61 K</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; font-size: small;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</p>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int.Cl.⁵	C 12 N, A 61 K								
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole													
Int.Cl.⁵	C 12 N, A 61 K													
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <th style="width: 10%; border: none;">Art[*]</th> <th style="width: 70%; border: none;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; border: none;">Betr. Anspruch Nr.¹³</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1, 4, 10, 11, 13</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --</td> <td style="border: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P, X</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007 -----</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-6, 10-13, 15-18</td> </tr> </table>			Art [*]	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1, 4, 10, 11, 13	A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --		P, X	Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007 -----	1-6, 10-13, 15-18
Art [*]	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³												
X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1, 4, 10, 11, 13												
A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --													
P, X	Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007 -----	1-6, 10-13, 15-18												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>¹⁰ • Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>														
IV. BESCHEINIGUNG <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. Mai 1991</td> <td style="width: 50%; border: none;">Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 28 JUN 1991</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt</td> <td style="border: none;">Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten MISS T. TAZELAAR</td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. Mai 1991	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 28 JUN 1991	Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten MISS T. TAZELAAR								
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. Mai 1991	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 28 JUN 1991													
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten MISS T. TAZELAAR													

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9100308
SA 44507

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 25/06/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0291021	17-11-88	DE-A- 3715840	01-12-88
		JP-A- 63287489	24-11-88
WO-A- 8706590	05-11-87	EP-A- 0267204	18-05-88
		JP-T- 1500117	19-01-89
		AU-A- 7351087	24-11-87
		ZA-A- 8702795	07-10-87

EPO FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82